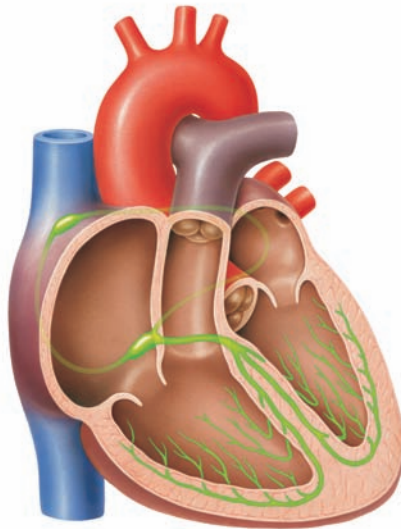


Smad4 als endogener Repressor von Hypertrophie in adulten Kardiomyozyten der Ratte

Farnoush Poursaket



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Zahnmedizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Smad4 als endogener Repressor von Hypertrophie
in adulten Kardiomyozyten der Ratte**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Farnoush Poursaket

Teheran

Giessen 2010

Physiologisches Institut

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper

Gutachterin: Prof. Dr. G. Euler

Gutachter: Prof. Dr. W. Wetzel

Tag der Disputation: 09.12.2010

Für Dieter und Vian

1	Einleitung.....	1
1.1	Mechanismen der kardialen Hypertrophie auf zellulärer Ebene	3
1.2	Regulatoren kardialer Hypertrophie	4
1.3	Der Transkriptionsfaktor Smad	6
1.4	Smad4	8
1.5	Zielsetzung	9
2	Material	11
2.1	Chemikalien	11
2.1.1	Vielfach verwendete Chemikalien	11
2.1.2	Inhibitoren.....	13
2.1.3	Antisenseoligonukleotide	13
2.1.4	Antikörper	13
2.2	Geräte und Laborbedarf.....	14
2.2.1	Zellpräparation und Zellkultur.....	14
2.2.2	System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion.....	14
2.2.3	Allgemein verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	14
2.2.4	SDS-PAGE	15
2.2.5	Auswertungs-Software	16
3	Methoden	17
3.1	Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten aus adulten Rattenherzen.....	17
3.1.1	Versuchstiere	17
3.1.2	Präparation isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten aus den Rattenherzen.....	17
3.2	Verwendete Lösungen	18
3.2.1	Kalzium-Stammlösung	18
3.3	Zellkultur von Kardiomyozyten der Ratte	19

Inhaltsverzeichnis	II
3.3.1 Vorplattieren der Kulturschalen	19
3.3.2 Ausplattieren der Kardiomyozyten	20
3.3.3 Kultivierung der isolierten Kardiomyozyten	20
3.4 Behandlung der Zellen	21
3.4.1 Stimulation der Kardiomyozyten	21
3.4.2 Transformation adulter Kardiomyozyten der Ratte mittels Smad4-Antisenseoligonukleotiden	21
3.5 Proteinnachweis	22
3.5.1 Isolierung von Gesamtprotein	22
3.5.2 Proteinmengenbestimmung	23
3.5.3 Lämmli-Färbung	24
3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
3.5.5 Western-Blot	26
3.6 Methoden zur Hypertrophieerfassung in Kardiomyozyten der Ratte	28
3.6.1 Quantifizierung der Proteinsynthese in Kardiomyozyten mittels Inkorporation von ¹⁴ C-Phenylalanin	28
3.6.2 Erfassung der Hypertrophie durch Bestimmung der Zellgrößen	29
3.7 Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld	30
3.7.1 Probenvorbereitung	30
3.7.2 Elektrische Stimulation zur Steuerung der Myokardzell-Kontraktion	30
3.7.3 Messung der Kontraktionsparameter	32
3.7.4 Messprotokoll	36
3.7.5 Statistik und Auswertung der Kontraktionsparameter	37
4 Ergebnisse	38
4.1 Rolle des Smad4-Proteins bei der Hypertrophieentstehung	38
4.1.1 Transformation von adulten Kardiomyozyten der Ratte mit Smad4-Antisense- Oligonukleotiden führt zur Reduktion der Smad4 Expression	38
4.1.2 Hemmung der Smad4-Expression führt zur Erhöhung der Proteinsyntheserate	39

4.1.3	Hemmung der Smad4-Expression führt zu einer Vergrößerung der Kardiomyozyten.....	40
4.1.4	Smad4 ist nicht an der α -adrenerg induzierten Hypertrophie beteiligt.....	41
4.2	Einfluss von Smad4 auf die Entstehung der Hypertrophie und daran beteiligte Signalwege.....	43
4.2.1	Rolle der PI3-Kinase, Protein-Kinase C und ERK bei der Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelten Hypertrophieentstehung	43
4.2.1.1	Hemmung der PI3-Kinase führt zur Reduktion der Proteinsyntheserate	43
4.2.1.2	Einfluss der Protein-Kinase C auf die Entstehung der Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelten Hypertrophie.....	44
4.2.1.3	Einfluss von ERK auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Hypertrophieentstehung	45
4.2.2	Hemmung der p38-MAP-Kinase führt zur Reduktion der Smad4-Antisense-Oligonukleotid induzierten Hypertrophie	46
4.2.3	Einfluss der NADPH-Oxidase auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Erhöhung der Proteinsyntheserate.....	47
4.2.4	Einfluss von ROS auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Erhöhung der Proteinsyntheserate	48
4.3	Kontraktionsverhalten Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierter Kardiomyozyten	50
4.3.1	Hemmung der p38-MAP-Kinase führt zur Verbesserung der Kontraktilität Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierter Kardiomyozyten	50
5	Diskussion.....	52
5.1	Modell für einen funktionellen Knock-Out von Smad4.....	52
5.2	Smad4 als Wachstumsrepressor in Kardiomyozyten und anderen Zelltypen	53
5.3	Signalwege der Hypertrophie.....	55
5.4	Einfluss von Smad4 auf die Kontraktilität.....	57
5.5	Smad4 als endogener Hypertrophierepressor	58
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick	59

Inhaltsverzeichnis	IV
6 Zusammenfassung	61
7 Summary.....	63
8 Literaturverzeichnis.....	65
9 Anhang.....	78
9.1 Publikationsverzeichnis.....	78

Verzeichnis der Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
β-MHC	β-Myosin Heavy Chain
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AMPK	Adenosin Monophosphat aktivierte Proteinkinase
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
AP-1	Aktivator Protein 1
APO	Apocynin
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
AS Smad4	Smad4-Antisense-Oligonukleotid
BMP	Bone Morphogenic Protein
BNP	B-type oder Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
cm	Centimeter
CRE	cAMP Response Element
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CREM	cAMP Response Element Modulator
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dpm	Zerfallsereignisse pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase

FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
GÖ 6976	[12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole]
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase 3- β
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
HDACs	Class II Histone Deacetylases
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
ICER	Inducible cAMP Early Repressor
JNK	c-Jun Amino-terminale Kinase
K	Kontrollbedingung
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
mA/cm ²	Milliampere pro Quadratzentimeter
MAPK	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
MEF2	Myocyte enhancer factor 2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLC 2	Myosin Light Chain 2
mM	Millimolar
n	Anzahl der Versuche
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Diphosphatnukleotid
NF-ATs	Nuclear Factor of Activated T-Cells
nm	Nanometer

nM	Nanomolar
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD 98059	(2'-Amino-3'-Methoxyflavon)
PE	Phenylephrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
SAPK	Stress-Aktivierte-Protein-Kinase
SB 202190	(FHPI,4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-Hydroxyphenyl)-5-(4-Pyridyl) 1H-Imidazole)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
Smad	Small Mother Against Decapentaplegic
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming Growth Factor beta
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vit.C	Vitamin C
W	Wortmannin

1 Einleitung

Nach Schätzung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz - und Kreislaufforschung gehören kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Ursachen für Mortalität und Morbidität in den Industrieländern. Eine immer größer werdende Prävalenz (Anzahl der Fälle) sowie Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) untermauert die Prognose, dass weltweit kardiovaskuläre Erkrankungen bis zum Jahre 2020 die führenden Todesursachen sein werden. Allein in Deutschland leiden offiziell 1,4 Millionen Patienten an Herzinsuffizienz. Die Prävalenz der Erkrankung steigt mit dem Alter deutlich an und erreicht bei Personen über 65 Jahren eine Erkrankungswahrscheinlichkeit von 6-10 % (Zugck, 2008). Laut der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung liegt das Risiko im Laufe des Lebens an Herzinsuffizienz zu erkranken bei ca. 20 % (Schunkert et al., 2003).

Das Syndrom Herzinsuffizienz ist nach WHO definiert als Unfähigkeit des Herzens, Blut bzw. Sauerstoff in dem Maße zu transportieren, dass es den Bedürfnissen des Organismus gerecht wird. Sie ist charakterisiert durch eine linksventrikuläre Dysfunktion und neurohumorale Fehlregulationen, welche mit Belastungsintoleranz, Flüssigkeitsretention und verkürzter Lebensdauer einhergehen (Herzinsuffizienz, 3. Auflage, 2003). Zu den häufigsten Ursachen der Ausprägung einer Herzinsuffizienz zählen die koronare Herzerkrankung mit konsekutivem Untergang der Myokardzellen und die arterielle Hypertonie. Weiterhin können Kardiomyopathien mit globaler Einschränkung der Pumpfunktion sowie Herzklappenerkrankungen oder aber auch toxische Ursachen zur Herzinsuffizienz führen. Selbst eine chronische Entzündung wie z.B. chronische Parodontitis kann zu Endokarditis (Sellmann, 2006) oder zu koronaren Herzerkrankungen (Dietrich et al., 2008) führen. Vorzeichen einer sich entwickelnden Herzinsuffizienz ist sehr häufig die Myokardhypertrophie.

Das Herz eines gesunden Menschen wiegt zwischen 250-350 Gramm. Ab einer Gewichtszunahme von 50 Gramm spricht man von einem hypertrophen Wachstum (Dreger, 2002). Dieses ist definiert als eine Zunahme der Zellgröße der einzelnen Zellen bei gleichbleibender Zellzahl (Abb.1). Kardiomyozyten sind terminal ausdiffe-

renzierte postmitotische Zellen, die die Fähigkeit der Zellteilung (Hyperplasie) nur in einem äußerst geringen Maße besitzen (Beltrami et al., 2001).

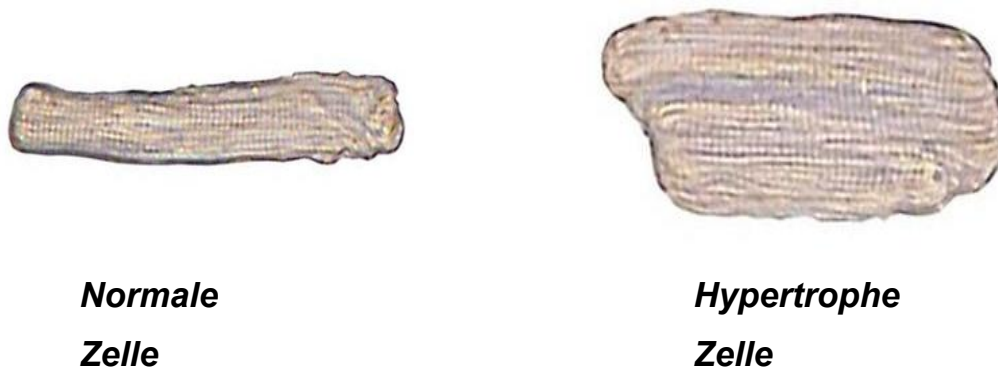


Abb.1.1 Dargestellt ist die lichtmikroskopische Aufnahme von adulten Kardiomyozyten der Ratte. Das linke Bild zeigt eine normale Zelle 24 Stunden nach der Zellpräparation. Rechts ist eine hypertrophierte Zelle dargestellt, 24 Stunden nach α -adrenerger Stimulation.

Bei einer erhöhten Arbeitsbelastung reagiert der Kardiomyozyt mit einer Zunahme seiner Zellgröße, um sich an die veränderte physiologische Zellfunktion anzupassen. Eine erhöhte Leistungsanforderung kann auf eine Zunahme der Druck- und/oder Volumenarbeit zurückzuführen sein und/oder durch hämodynamischen, hormonellen und biomechanischen Stress erzeugt werden. Die charakteristische Veränderung bei einer Hypertrophie als Reaktion auf eine vermehrte Arbeitsbelastung sind eine Volumenzunahme um den Faktor 2 bis 3 (Messerli et al., 1993), der Anstieg des Proteingehalts (Olson et al., 2003), sowie die Reexpression fetaler Gene (Chien, 1999, Hardt et al., 2004). Das fetale Genmuster ist gekennzeichnet durch Expression von ANP und BNP (Hanford et al., 1994), von Strukturproteinen wie β -MHC, α -skeletales Aktin (Calderone et al., 1995), sowie ventrikuläres MLC-2 (Lee, 1988) und α -kardiales Aktin (Long, 1989). Außerdem ist eine Veränderung der Kontraktilität zu beobachten (Pinson et al., 1993). Bei diesem, zunächst noch weitgehend reversiblen, Vorgang der Hypertrophie ist die Zunahme des Proteingehalts der Zellen vor allem durch einen Anstieg der allgemeinen Proteinsyntheserate zu erklären (Sugden et al., 1991), da die Degradation der Proteine weitgehend unverändert bleibt (McDermott et al., 1989). Der Adaptationsfähigkeit des Herzens sind jedoch Grenzen gesetzt. Eine persistierende Dauerbelastung führt unbehandelt dazu, dass das Herzgewicht die

kritische Masse von 500 Gramm überschreitet, wodurch der adaptive Charakter der Hypertrophie verloren geht. In der Folge kann das Kapillarsystem des Herzens die Blutversorgung des vergrößerten Herzens nicht mehr ausreichend gewährleisten. Es kommt zu einer strukturellen Schädigung, einem Kontraktilitätsverlust und damit zum Leistungsabfall des Herzens.

1.1 Mechanismen der kardialen Hypertrophie auf zellulärer Ebene

Die Hypertrophie eines Kardiomyozyten kann durch verschiedene Stimuli wie Hypoxie (Ito et al., 1996), Dehnung (Komuro et al., 1991), Zell-Zell-Kontakt (Clark et al., 1998), erhöhten biomechanischen Stress, sowie neurohumorale Signale (Morgan et al., 1991) ausgelöst werden. Zu den klassischen Hypertrophiewegen gehören: die Renin-Angiotensin-System (RAS) induzierte Hypertrophie, die β -adrenerg induzierte Hypertrophie und die α -adrenerg induzierte Hypertrophie. In der Zelle werden hierfür verschiedene Signalwege eingeleitet, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Proteinkinasen wie MAPK (Molkentin et al., 2001), PI3K (Roberts, 2002) und PKC (Puceat et al., 1996) oder auch Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Taimor et al. 2004) oder GATA (Molkentin, 2000, Pikkarainen et al. 2004) vermittelt werden. Dabei ist die Aktivierung jeder einzelnen dieser Komponenten ausreichend, um myokardiale Hypertrophie zu induzieren (KANG, 2006). MAPKs spielen in den wichtigsten Signaltransduktionskaskaden der Hypertrophie eine zentrale Rolle. Unterschieden werden drei MAPK-Subfamilien: 1. die extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK 1/2, auch MAPK p44/42 genannt), 2. die c-jun N-terminal Kinase/ Stress-Aktivierte-Protein-Kinase (JNK/ SAPK) und 3. die p38-MAP-Kinase.

Auslöser der kardialen Hypertrophie des RAS ist Angiotensin II (AngII). Die Bindung von Ang II an den AT₁-Rezeptor löst einen redoxsensitiven Signalschritt aus, wobei NAD(P)H-Oxidasen vom glattmuskulären Typ aktiviert werden. Diese bilden aus molekularem Sauerstoff Sauerstoffradikale (reaktive Sauerstoffspezies, ROS), welche wiederum die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. Die aktivierte Proteinkinase C phosphoryliert dann im nächsten Schritt p38-MAPK und JNK (Wenzel et al., 2001). Dies führt zu einer erhöhten Aktivität von AP-1, welches nach Bindung an die DNA eine gesteigerte Expression prohypertropher Gene induziert (Wenzel, 2005).

Die Signaltransduktion β -adrenerger Hypertrophie, eingeleitet z.B. durch Isoprenalin, läuft über die Aktivierung der β_2 -Adrenozeptoren (Zhou et al., 1996). Im Verlauf der β -adrenergen Wachstumsregulation kommt es ebenfalls zur Aktivierung der PI3-Kinase und der p70s6-Kinase, welche durch die Proteinkinase A vermittelt wird (Schlüter, 1998, Simm et al., 1998).

Signalwege der α -adrenerg induzierten Hypertrophie sind eingehend an isolierten Kardiomyozyten untersucht worden. Pönicke et al. konnten zeigen, dass der α -adrenerg vermittelte Anstieg der Proteinsynthese durch die Aktivierung von PKC, PI3-K und p70s6 Kinase vermittelt wird (Pönicke et al., 2001). Weitere Mediatoren sind die AKT Kinase (Kim et al., 2003), sowie Ca^{2+} -Calmodulin als Aktivator von Calcineurin (Gruver et al., 1993). Die Stimulation von Kardiomyozyten mit dem α -Adrenozeptoragonisten führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, der als essentieller Mediator der α -adrenerg induzierten Hypertrophie beschrieben wurde (Taimor et al., 2004).

1.2 Regulatoren kardialer Hypertrophie

Grundsätzlich kann das Zellwachstum durch zwei entgegengesetzte Mechanismen beeinflusst werden (Abb.1.2), die über sogenannte positive und negative Regulatoren gesteuert werden. Durch ein Gleichgewicht zwischen den positiven und negativen Regulatoren in der Zelle ist ein kontrolliertes Wachstum gewährleistet. Das Gleichgewicht kann allerdings durch eine vermehrte Aktivität der prohypertrophen Regulatoren und/oder eine Hemmung der antihypertrophen Regulatoren gestört werden, wodurch kein balanciertes Wachstum mehr existiert und sich eine Hypertrophie entwickeln kann.

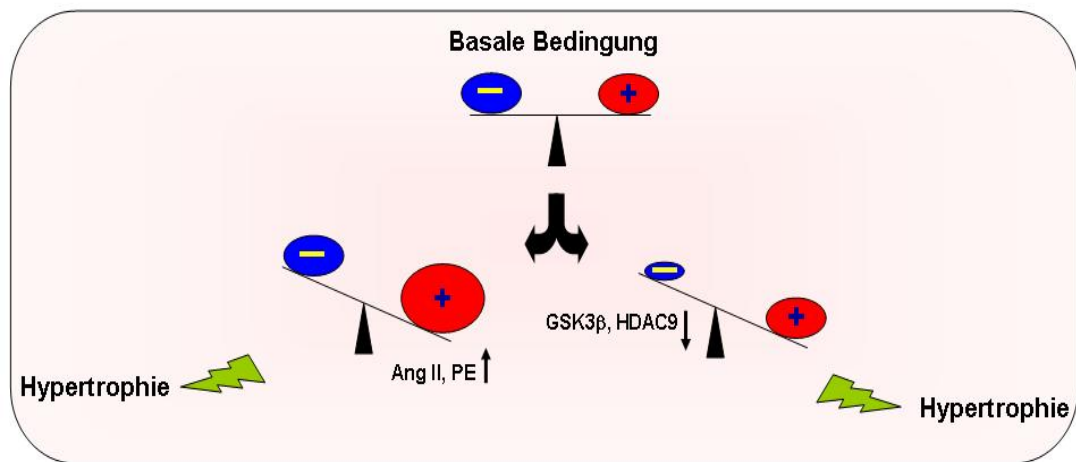


Abb.1.2 Schematische Darstellung der Regulation von Hypertrophie. Ist die Balance zwischen den positiven und negativen Regulatoren gestört, entsteht hypertrophes Wachstum. Links überwiegen die Hypertrophie induzierenden Regulatoren (Ang II, PE), während die negativen unverändert bleiben. Rechts bleiben die positiven Regulatoren unverändert, wobei die Hypertrophie hemmenden Regulatoren (GSK-3 β , HDAC9) in ihrer Aktivität oder Expression reduziert werden.

Wie bereits in 1.1. beschrieben, haben zahlreiche Studien in den letzten Jahren den Effekt der positiven Regulatoren auf die Entstehung bzw. Entwicklung der kardialen Hypertrophie untersucht. In jüngster Zeit wurden nun endogene Moleküle mit negativ regulierendem Einfluss auf die kardiale Hypertrophie beobachtet. Man kann die endogenen, negativen Regulatoren der kardialen Hypertrophie in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe ist konstitutiv aktiv. Nach hypertropher Stimulation nimmt ihre Aktivität ab. Diese sind somit unter basalen Bedingungen aktiv und halten eine Balance zwischen hypertrophen und antihypertrophen Stimuli. Ein Beispiel für eine negative Regulation liefert GSK-3 β , eine Serin/Threonine Kinase, die in einer ganzen Reihe zellulärer Funktionen wie Genexpression, Proteintranslation und im Zytoskelett integriert ist (Doble et al., 2003). Durch eine Phosphorylierung von c-Jun, eine Unter-einheit von AP-1, durch GSK-3 β ist die DNA-Bindungsaktivität von c-Jun reduziert (Sugden et al., 2008). Daraus resultiert eine Verminderung der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 (Haq et al., 2000), der eine Rolle bei der α -adrenerg vermittelten kardialen Hypertrophie spielt (Taimor et al., 2004). Darüber hinaus führt eine Phosphorylierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF-AT, durch GSK-3 β zu einer Inaktivierung von NF-AT. Dadurch wird NF-AT aus dem Zellkern exportiert und die

Transkription bleibt aus. Dies führt zu einer Suppression des prohypertrophen Effektes (Haq et al., 2000).

Ein weiterer, negativer Regulator der 1.Klasse konstitutiv aktiv endogener Molekülen ist HDAC9. Zhang et al. (2002) zeigten, dass HDAC9 einen antihypertrophen Effekt in unstimulierten Kardiomyozyten der Maus hat. HDAC9 ist im Zellkern lokalisiert und hat einen negativen Einfluss auf den Transkriptionsfaktor MEF2, wodurch hypertrophes Wachstum verhindert wird. Tritt HDAC9 aus dem Zellkern als Antwort auf einen adäquaten Reiz aus, verliert es seinen negativen Einfluss auf MEF2 und als Folge entwickelt sich Hypertrophie in Kardiomyozyten (Zhang et al., 2002).

Die zweite Gruppe negativer Regulatoren hat die Funktion eines negativen Feedback-Regulators, der basal kaum oder gar keine Aktivität aufweist. Nach hypertropher Stimulation werden diese Moleküle aktiviert (Hardt et al., 2004). Hierzu gehört ICER, ein Transkriptionsfaktor, der ein Mitglied der cAMP response element binding protein (CREB) und CRE Modulator (CREM)-Familie ist und als nuklärer Antagonist von CRE wirkt. Eine Überexpression von ICER wird durch einen Anstieg von cAMP oder intrazellulären Ca^{2+} ausgelöst. Er wird unter hypertrophen Bedingungen durch einen β -adrenergen Stimulus in Kardiomyozyten hochreguliert. Dies geschieht durch CRE-abhängige Mechanismen. cAMP response element binding (CRE) ist die DNA-Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors. Diese Hochregulation des Transkriptionsfaktors ICER führt wiederum zur Hemmung der CRE-vermittelten Transkription, zu einer Runterregulation der β -adrenergen Rezeptoren, zur Hemmung von AP-1 und zur Reduktion der Hypertrophieentwicklung (Folco et al. 1997, Tomita et al. 2003, Hardt et al., 2004).

1.3 Der Transkriptionsfaktor Smad

Smads sind eine Klasse von Proteinen, die als zytoplasmatische und nukleäre Transkriptionsfaktoren agieren. Ihre Rolle im kranken Herzen ist besonders interessant, da neben fibrotischen Effekten Smads auch einen direkten Einfluss auf Kardiomyozyten und das Kreislaufsystem haben. Smads sind vor allem als klassische Signaltransduktoren der TGF β -Superfamilie bekannt (Rodríguez-Vita et al.,

2005) und werden aufgrund unterschiedlicher Struktur und Funktion in drei Subklassen eingeteilt: (Massagué et al., 2005, Oka et al., 2007).

- ▶ Rezeptor Smads (R-Smad1, R-Smad2, R-Smad3, R-Smad5 und R-Smad8)
- ▶ Cofaktor Smad (Co-Smad4)
- ▶ Inhibitorische Smads (I-Smad6 und I-Smad7)

In nicht aktivierten Zellen befinden sich R-Smads überwiegend im Zytoplasma, während Co-Smad4 gleichmäßig im Zytoplasma und im Zellkern verteilt ist und I-Smads hauptsächlich im Zellkern zu finden sind (Liu et al., 1997). Nach Stimulation des Rezeptors durch die TGF β -Superfamilie werden R-Smads durch Phosphorylierung aktiviert. Diese binden an Smad4 und bilden ein Heteromer. Dieser Komplex wandert anschließend in den Zellkern hinein und reguliert dort durch Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz, das Smad Binding Element (SBE), die Transkription bestimmter Gene (Abb.1.3) (Massague 1998, Feng et al., 2005). Die Bindung von Smads an die DNA ist relativ schwach. Smads interagieren aber mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1, wodurch ihre Bindung verstärkt wird. Je nach Zelltyp und Stimulus gibt es unterschiedliche Smad-Partnerproteine, wodurch jeweils unterschiedliche Zielgene positiv oder negativ reguliert werden können. Dies spiegelt sich in den verschiedenartigen zellulären Effekten von TGF β_1 wider (Massague et al., 2000).

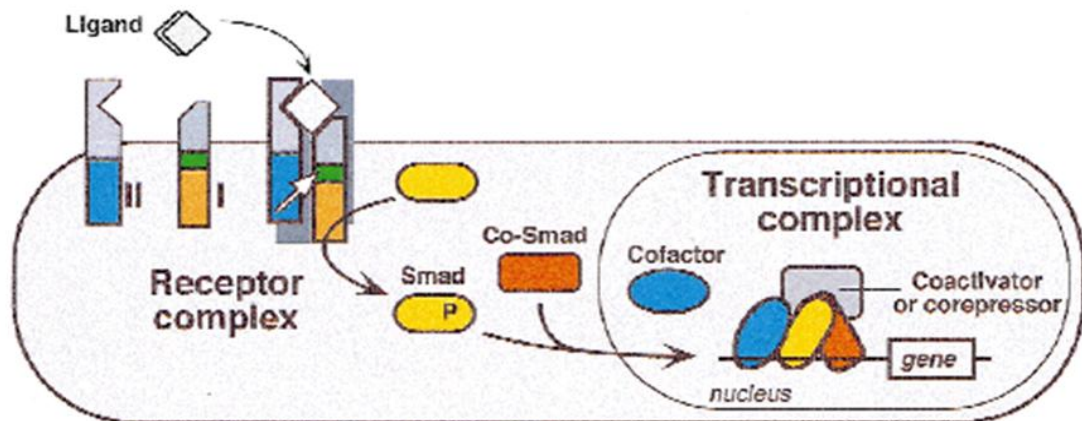


Abb.1.3 Schematische Darstellung der TGFβ/Smad Signalkaskade (Massague und Chen 2000). Die Bindung eines der TGFβ-Superfamilienmitglieder an den Rezeptor führt zur einer Dimerisierung und Phosphorylierung des Rezeptors. Dieser wiederum phosphoryliert R-Smads. Sie binden an Smad4 und bilden ein Heteromer. Anschließend wandert dieser Komplex in den Zellkern und bindet an eine spezifische DNA-Sequenz, das Smad Binding Element (SBE).

Die TGFβ-Superfamilie wird in die TGFβ/Activin- und die Bone Morphogenic Protein-Familie (BMP) eingeteilt (Moustakas et al., 2001) und spielt in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Während TGFβ-Mitglieder eher negative Effekte auf das adulte Herz haben, sind BMP-Mitglieder essenziell für die Herzentwicklung und fördern die Differenzierung der Kardiomyozyten (Monzen et al., 2001). Dabei sind Smad2 und Smad3 vornehmlich die Signalmoleküle, die von TGFβ und Activin aktiviert werden und an der Apoptose beteiligt sind. Smad1, 5 und 8 Transkriptionsfaktoren, die durch die BMP-Familie aktiviert werden, spielen bei der Entwicklung und dem Wachstum des Herzens eine Rolle (Derynck et al., 2003, ten Dijke et al., 2004).

1.4 Smad4

Smads spielen nicht nur im Apoptosegeschehen adulter Kardiomyozyten eine essenzielle Rolle. Als einziges Co-Smad ist Smad4 in der Signaltransduktion von der Zellmembran in den Zellkern Dreh- und Angelpunkt des Smad-Signallings, da es bei allen Smad-vermittelten Signalwegen der TGFβ-Superfamilie beteiligt ist (Euler-

Taimor, 2006). Seit Jahren ist Smad4 als tumorsupprimierender Faktor bekannt. Der Verlust von Smad4 oder dessen Funktion führt zur Karzinogenese in humanen und muralen Pankreas-, Kolon- und weiteren Intestinalzellen (Koinuma et al., 2009). In Brustkrebszelllinien konnten Dai et al. zeigen, dass Smad4 inhibierend auf die Zellproliferation wirkt (1998). Des Weiteren stellte Go (2008) dar, dass die Entwicklung von humanen T-Zell-Lymphomen mit einer Reduktion der Smad4-Expression einhergeht. Dies zeigt, dass in der Krebsentstehung ein Fehlen von funktionellen Smad4 zur Entartung und damit Wachstum der Zelle führt.

Des Weiteren ist Smad4 an der Herzentwicklung der Maus beteiligt. Eine gezielte Unterbindung von Smad4 führt zum Tod der Tiere in der frühen Embryonalzeit (Yang et al., 1998, Sirard et al., 1998). Bezüglich der Hypertrophieentwicklung im Herzen ist wenig über den Einfluss von Smad4 bekannt. Die ersten Hinweise für eine Beteiligung von Smad4 an Hypertrophie zeigte Wang et al. (2005) mit der Analyse einer herzspezifischen Smad4 Knock-Out Maus. Diese Tiere entwickelten eine kardiale Hypertrophie, die durch eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, Fibrose und Reexpression verschiedener fetaler Gene gekennzeichnet war (Wang et al., 2005). Ein weiterer Hinweis, dass Smad4 mit Hypertrophie assoziiert ist, konnte in adulten Kardiomyozyten der Ratte gezeigt werden, die mit einem Smad4 überexprimierenden Adenovirus infiziert wurden. Während nicht-infizierten Kardiomyozyten auf eine α -adrenerge Stimulation mit einer Erhöhung der Proteinsyntheserate und Vergrößerung der Zellgröße reagierten, konnte bei Smad4 überexprimierenden Zellen keine Hypertrophieentwicklung nach α -adrenerge Stimulation beobachtet werden (Heger et al., 2009). Smad4 hemmt somit die Hypertrophieentwicklung in der Zelle. Diese Beispiele deuten darauf hin, dass Smad4 eine bedeutende Rolle als Regulator der Hypertrophie hat.

1.5 Zielsetzung

In den letzten Jahren haben Smad-Proteine immer mehr Bedeutung für die Pathophysiologie des Herzens gefunden. Dabei lag der Schwerpunkt der Untersuchungen in der Erforschung der Apoptose. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Smads auf das Wachstum der isolierten Kardiomyozyten der Ratte untersucht werden. Dabei

wurden insbesondere folgende Fragen analysiert. Führt ein akuter Knock-Down von Smad4 in Kardiomyozyten der Ratte zur Entwicklung von Hypertrophie? Es sollte schwerpunktmäßig analysiert werden, inwieweit Smad4 das Wachstum der isolierten Kardiomyozyten der Ratte beeinflusst. Im Weiteren sollten intrazelluläre Signalkaskaden unter Smad4-Reduktion untersucht werden. Außerdem sollte analysiert werden, ob Kinasen der bekannten, klassischen Signalwege der Hypertrophie involviert sind und ob durch Hemmung von Kinasen wie p38-MAP-Kinase, PI3-Kinase, ERK und PKC diese ausgelöste Hypertrophie gehemmt werden kann. Schließlich wurde abgeklärt, ob eine Smad4-Reduktion auch einen Einfluss auf die Kontraktilität der Zelle hat und über welche Signalwege ein solcher Einfluss vermittelt wird.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien

^{14}C -Phenylalanin	Amersham, Mannheim
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Albumin	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Roche Diagnostics, Mannheim
Carbogen	Linde, Pullach
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Fluka Marker 69813	Sigma, Taufkirchen
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe

Glycin	Applichem, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hydroxymethylfurylbenzylindazol	Merck, Darmstadt
Isoprenalin	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
Kreatinphosphat	Roche, Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Neonatales Kälberserum	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Taurin	Sigma, Taufkirchen
TCA	Merck, Darmstadt
Tris/ HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Für Lösungen, Medien und Puffer wurde aqua bidest. als Lösungsmittel verwendet, falls nichts anderes angegeben ist.

2.1.2 Inhibitoren

APO	Apocynin	Calbiochem, Schwalbach
GÖ 6976	[12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole,GÖ 6976]	Calbiochem, Schwalbach
PD 98059	(2'-Amino-3'-methoxyflavon)	Calbiochem, Schwalbach
SB 202190	(FHPI, 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-Pyridyl) 1H-imidazole)	Calbiochem, Schwalbach
Vit.C	Vitamin C, Ascorbinsäure	Calbiochem, Schwalbach
W	Wortmannin	Calbiochem, Schwalbach

2.1.3 Antisenseoligonukleotide

AS Smad4	5'-GTT GCA GAT AGC TTC AGG GC-3'	Invitrogen, Karlsruhe
	5'-TGC TGA AGA TGG CCG TTT TGG	
	TG-3'	

2.1.4 Antikörper

Smad4	Cell Signaling
Aktin	Sigma
anti rabbit HRP	Dianova
anti mouse HRP	Dianova

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Zellpräparation und Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau des Physiologischen Instituts
Gewebehacker	Harvard Scientific, Holliston, MA, USA
Nylonnetz	Neolab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
CHEM-SMART TH 5100	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.2.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion

Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Physiologisches Labor des Physiologischen Instituts der J.-L.-Universität Giessen
Stimulator	Physiologisches Labor des Physiologischen Instituts der J.-L.-Universität Giessen

2.2.3 Allgemein verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Demineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Glasware	Schott, Mainz
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnetheizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen

Mischer/Schüttler	Heidolph, Kelheim
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Techne Dri-Block® DB.2D	Techne AG, Burkhardtsdorf
Wasserbad (Typ: Julabo U3)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen	Kendro, Hanau
Kulturschalen (Typ Falcon 3001)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylon (Typ: Hybond-N 0,45 Micron)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresekammer	GE Healthcare Europe, München

2.2.4 SDS-PAGE

Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Immobilon P	Millipore, Eschborn
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen
Nitrozellulose Membran	Whatmann® GmbH, Dassel
Trockenpapier Universal	BIOTECH-Fischer GmbH, Reiskirchen

2.2.5 Auswertungs-Software

Corel Photo Paint®	Corel Inc USA
Image Quant	Molecular Dynamics Krefeld
Microsoft Excel 2000®	Microsoft Corp., USA
Microsoft Powerpoint 2003	Microsoft Corp., USA
Microsoft Windows XP	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word 2003®	Microsoft Corp., USA
MUCEL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Photoshop Adobe (Version 5)	Adobe Systems, California
Quantity One	Molecular Dynamics Krefeld
SPSS (Version 17.1)	SAS Institute Inc, Cary, N.C., USA

3 Methoden

3.1 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten aus adulten Rattenherzen

3.1.1 Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus adulten männlichen Wistar-Ratten, die ein Lebendgewicht von 250-350 g aufwiesen, isoliert. Die Aufzucht der Tiere fand im hauseigenen Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen statt. In der Haltung stand ihnen Futter (Standardfutter: Altromin[®]) und Wasser ad libidum zur Verfügung.

3.1.2 Präparation isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten aus den Rattenherzen

Die Isolierung der ventrikulären Kardiomyozyten wurde nach der von Piper et al. (1982) beschriebenen Methode durchgeführt. Die hierbei verwendete Langendorff-Perfusionsanlage wurde zu Beginn der Präparation zuerst mit bidestilliertem Wasser gespült und danach mit Powell-Medium luftblasenfrei gefüllt. Das Powell-Medium wurde während der gesamten Isolationsdauer und der Perfusion mit Carbogen[®] begast und über einen Thermokreislauf auf 37°C erwärmt, um einen konstanten pH-Wert zu gewährleisten. Die Ratten wurden nach einer kurzen Diethylethernarkose, die zum Erreichen einer tiefen Bewusstlosigkeit führte, per Genickbruch getötet und der Thorax eröffnet. Nach dem Entfernen des Zwerchfells wurde das herauspräparierte Herz mitsamt der Lunge sofort in eine Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung überführt. Das freipräparierte Herz wurde mit der Aorta ascendens an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gehängt. Um eine Blutleere des Organs zu erreichen, erfolgte darauf die Spülung des Herzens mit ca. 40 ml Powell-Medium. Anschließend wurde das Herz rezirkulierend mit 50 ml

Kollagenase-Puffer für 25 Minuten perfundiert. Die Flussrate, die durch ein Ventil reguliert wurde, betrug ein Tropfen pro Sekunde.

3.2 Verwendete Lösungen

3.2.1 Kalzium-Stammlösung

CaCl ₂	100 mmol/l
-------------------	------------

Powell-Medium: (Carbogen® begast)

NaCl	110 mmol/l
NaHCO ₃	25 mmol/l
Glukose	11 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
Mg ₂ SO ₄ x H ₂ O	1,2 mmol/l

Kollagenase-Puffer:

Powell-Medium	50 ml
Kollagenase	20-25 mg (chargenabhängig)
Kalzium-Stammlösung	12,5 µl

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe und die Aorta entfernt und die Ventrikel mittels eines Gewebhackers (Schnittabstand 0,7 mm) in zwei Ebenen mechanisch zerkleinert. Der Gewebebrei wurde für fünf Minuten bei 37°C mit 30 ml Kollagenase-Puffer unter ständiger Carbogen®-Begasung nachverdaut. Zur Unterstützung der Trennung der einzelnen Zellen wurde die Suspension mittels einer fünf ml Pipette alle ein bis zwei Minuten vorsichtig auf- und abpipettiert, dann folgte eine Filtration der Suspension durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 200 µm. Die Trennung der Zelltrümmer, kleinerer Zellen und der Kollagenaselösung von den intakten Kardiomyozyten wurde durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 25 x g

erreicht. Um eine langsame Gewöhnung der Kardiomyozyten an Kalzium und eine erhöhte Zelltrennung zu erreichen, wurde eine Resuspension des Sediments in Powell-Medium mit 200 µmol/l CaCl_2 und eine erneute Zentrifugation bei 25 x g für zwei Minuten durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme des hierdurch gewonnenen Zellpellets in Powell-Medium mit einem CaCl_2 -Anteil von 400 µmol/l, dass zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt wurde. Die hierdurch gewonnene Zellsuspension wurde entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläser, die vorher mit einer ca. zehn cm hohen Flüssigkeitssäule des Powell-Mediums gefüllt waren, verteilt. Man erhielt nach einer erneuten einminütigen Zentrifugation bei 20 x g eine Zellpopulation im Sediment, die zu 90% aus intakten, stäbchenförmigen ventrikulären Kardiomyozyten bestand.

3.3 Zellkultur von Kardiomyozyten der Ratte

3.3.1 Vorplattieren der Kulturschalen

Um ein optimales Anheften der isolierten Kardiomyozyten auf den verwendeten Kulturschalen Falcon Typ 3004 zu gewährleisten, wurden diese mit Vorplattiermedium beschichtet und für mindestens zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, welches unmittelbar vor dem Ausplattieren der Kardiomyozyten abgesaugt wurde.

Vorplattiermedium:

CCT-Medium (sterilfiltriert, pH 7,4)	x ml
FCS	4 % (v/v)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml

CCT-Medium (sterilfiltriert):

M199 / HEPES gepuffert	x ml
Kreatin	5 mmol/l

Taurin	5 mmol/l
Karnitin	2 mmol/l
Cytosin- β -Arabinofuranosid	10 μ mol/l
pH	7,4

CCT-Kulturmedium:

CCT-Medium	x ml
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

3.3.2 Ausplattieren der Kardiomyozyten

Die unter 3.1. isolierten Kardiomyozyten wurden in 20 ml CCT-Kulturmedium, das zuvor auf 37°C erwärmt wurde, homogen resuspendiert. Diese wurden dann mit einer Dichte von etwa 5×10^4 Zellen pro ml ausplattiert. Die Präparationsqualität der intakten Kardiomyozyten wurde unmittelbar nach dem Ausplattieren mikroskopisch auf Stäbchenform und Spontankontraktion kontrolliert. Die Zellen wurden danach zum Anheften für ca. ein bis zwei Stunden bei 37°C unter CO₂-freien Bedingungen inkubiert.

3.3.3 Kultivierung der isolierten Kardiomyozyten

Nach der bereits beschriebenen Anheftungsphase wurden die ausplattierten Kardiomyozyten mit CCT-Kulturmedium zweimal gewaschen, um nicht angeheftete Zellen zu entfernen. Anschließend wurde auf jede Schale vom Typ Falcon 3001 (\varnothing 3 cm) ein ml des CCT-Mediums als Endvolumen gegeben. Bei Versuchen, bei denen eine Inkubation der Zellen über 24 Stunden erforderlich war, wurde dem CCT-Medium zusätzlich Gentamycin (10 μ g/ml) zugegeben.

3.4 Behandlung der Zellen

3.4.1 Stimulation der Kardiomyozyten

Zur Induktion von Hypertrophie wurden die isolierten ventrikulären Kardiomyozyten unmittelbar nach dem Waschen mit fünf μl Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) transformiert und für ca. fünf Stunden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchte und normoxen Bedingungen inkubiert, bevor sie mit verschiedenen Inhibitoren/Stimulatoren behandelt wurden. Als Positivkontrolle für die Induktion der Hypertrophie wurde der α -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin (10 μM) verwendet. Zur Erforschung der Signalwege, die an der Smad4 abhängige Hypertrophie beteiligt sind, wurden die Zellen mit spezifischen Inhibitoren nach der Transformation der Zellen mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden inkubiert. Außerdem wurden zeitgleich ausplattierte unbehandelte Zellen als Kontrollproben für jede Versuchsbedingung herangezogen.

Inhibitor:

APO (10 μM)

GÖ 6976 (100 nM)

PD 98059 (10 μM)

SB 202190 (10 μM)

Vit.C (10 μM)

W (10 nM)

Signalweg:

NADPH-Oxidase

PKC

ERK

p38-MAP-Kinase

ROS

PI3-Kinase

3.4.2 Transformation adulter Kardiomyozyten der Ratte mittels Smad4-Antisenseoligonukleotiden

Isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten der adulten Ratte wurden nach dem Waschen mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformiert. Eine Inkubationszeit von fünf Stunden reicht aus, damit Kardiomyozyten die Oligonukleotide aufnehmen können (Taimor et al., 2001). Die Sequenzen der beiden verwendeten Antisense-

Oligonukleotide sind komplementär zur Smad4-mRNA-Sequenz. Ein Oligonukleotid bindet vor und das andere hinter dem Translationstartpunkt der mRNA, wodurch sie die Translation der RNA und letztlich die Expression von Smad4 verhindern. Die Spezifität der Smad4-Antisense-Oligonukleotide wurde bereits in früheren Studien gezeigt, wo die Transformation von Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden die TGF β -induzierte und Smad-abhängige Apoptose verhinderte (Schneiders et al., 2005).

3.5 Proteinnachweis

3.5.1 Isolierung von Gesamtprotein

Um das Gesamtprotein zu isolieren, wurden die Kardiomyozyten nach entsprechender Inkubationszeit zunächst zweimal mit kalter 1xPBS-Lösung gewaschen. Danach wurde die PBS-Lösung abgesaugt und die Kardiomyozyten mit 200 μ l Ripa-Puffer überschichtet. Nach Abschaben der Zellen mit einem Zellschaber wurden die lysierten Zellen in Reaktionsgefäße überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann folgte die Zentrifugation der Reaktionsgefäße für 30 min bei 12000 Upm und vier Grad Celsius. Der Überstand enthielt die Gesamtproteinfraktion.

10 x PBS:

KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	150,0 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	8,1 mM

Ripa-Stocklösung:

Tris pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

Nonidet P 40	1 % (wt/vol)
Deoxycholat	0,5 % (wt/vol)
SDS	0,1 % (wt/vol)

Ripa-Puffer (1 ml):

Ripa Stocklösung	945 µl
PMSF (0,1 M)	10 µl
EDTA (0,2 mM)	5 µl
β-Glycerophosphat (1 M)	40 µl
Pepstatin	

3.5.2 Proteinmengenbestimmung

Um die Proteinmenge der einzelnen Proben zu bestimmen, wurde ein Lowry durchgeführt. Die dazu benötigte Standardverdünnungsreihe von BSA wurde in Wasser hergestellt (0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml). Es wurden dann Mischungen von der Standardreihe mit Ripa Puffer und von den Proben mit Wasser auf folgende Weise hergestellt:

Standardreihe jeweils 50 µl + 10 µl BSA

Proben jeweils 10 µl + 50 µl Wasser

Anschließend wurde jedem Ansatz 50 µl NaOH (0,5 M) und 500 µl Reagenz A zugesetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation der Ansätze bei Raumtemperatur wurden 100 µl Folinciocalteusches Phenolreagenz (Merck 9001; 22,73ml Originalreagenz/l Milipore Wasser) zugegeben. Die Zentrifugation für 30 min bei 13000 Upm folgte nach 30 min Inkubation bei 37°C. Von den Überständen der Standardreihe und der Proben wurden je 200 µl auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und im Photometer bei 578 nm gemessen. Danach wurden die einzelnen Proteinkonzentrationen durch eine Standardgerade mit Hilfe des BSA-Standards ermittelt.

Reagenz A:

Na-K-Tatrat (3,3 % wt/vol)	200 µl
CuSO ₄ (1,25 % wt/vol)	200 µl
Na ₂ CO ₃ (2,5 % wt/vol)	19,6 ml

3.5.3 Lämmli-Färbung

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden pro Probe 50 µg Protein in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gegebenenfalls mit Ripa-Puffer auf 45 µl aufgefüllt. Dann wurden 15 µl 4x Lämmli Puffer und 1,8 µl DTT zugeführt. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C aufgeköcht und zur Abkühlung sofort wieder auf Eis gestellt. Das Aufkochen und das SDS führen zur Denaturierung der Proteine. Durch das DTT wird die Reduktion von Disulfidbrücken erreicht. Das führt dazu, dass die Proteine, bedingt durch die Sulfatgruppen, eine gleichmäßig verteilte negative Ladung besitzen und so aufgetrennt werden können.

4 x Lämmli-Puffer:

Tris, 1 M, pH 6,8	2,5 ml
SDS, 20 %	4 ml
Glycerin	2 ml
DTT	154 mg
Bromphenolblau	1 mg
Wasser	1,5 ml

3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelkammer besteht aus zwei Glasplatten, zwei Plastikspacern und einem Gummischlauch dazwischen, die durch mehrere Klemmen zusammengehalten werden. Nachdem das Trenngel gemischt und vorsichtig zwischen die zwei

Glasplatten bis etwa vier cm unterhalb des oberen Randes eingefüllt wurde, folgte das Überschichten des Gels mit einem ml SDS (0,1%). Das SDS wurde nach einer 30 minütigen Auspolymerisierung des Trenngels entfernt und anschließend das Sammelgel eingefüllt und der Kamm sofort luftblasenfrei eingesteckt.

Trenngel, 10 %:

Acrylamid, 30 %	6,6 ml
H ₂ O Millipore	8,4 ml
Tris, 1,5 M, pH 8,8	5 ml
SDS, 10 % (wt/vol)	200 µl
APS, 10 % (wt/vol)	50 µl
TEMED	40 µl

Sammelgel:

Acrylamid, 30 %	1,675 ml
H ₂ O Millipore	6,75 ml
Tris, 1,5 M, pH 6,8	1,25 ml
SDS, 10 % (wt/vol)	100 µl
APS, 10 % (wt/vol)	100 µl
TEMED	20 µl

Nach 20 minütiger Auspolymerisierung des Sammelgels wurde das fertige Gel in die Gelelektrophoresekammer eingebaut und die Kammer mit Lämmli-Laufpuffer befüllt. Nach dem Entfernen des Kamms wurden die Proben mit einer Hamilton-Spritze in die einzelnen Taschen eingefüllt. Es wurden zwei unterschiedlichen Protein-Marker jeweils in die beiden letzten Taschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde für drei Stunden bei 200 V durchgeführt. Wie unter 3.5.3 beschrieben besitzen die Proteine alle eine gleichmäßige positive Ladung. Deshalb werden die einzelnen Proteine nur aufgrund ihrer relativen Molekülmasse voneinander getrennt. Die Moleküle wandern im Trenngel je nach Größe mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Je größer das

Molekül, desto langsamer wandert es im Gel. Durch das Sammelgel wird eine schärfere Bandentrennung erzielt. Das Sammelgel unterscheidet sich von dem Trenngel im pH-Wert und in der Porengröße. Aufgrund der in der Matrix des Sammelgels vorhandenen größeren Poren wandern die Moleküle schnell und gleichmäßig, unabhängig von der Größe und ohne Auftrennung bis zur Grenzschicht. An dieser Stelle werden sie stark verlangsamt und je nach Größe im Trenngel aufgetrennt.

Lämmli-Laufpuffer:

Glycin	14,4 g
Tris	3,03 g
SDS	10 g
Millipore Wasser	Ad 1l

3.5.5 Western-Blot

Zum Nachweis einzelner Proteine mit Antikörpern werden die Proteine erst auf eine Membran übertragen. Dafür wird ein Semi-dry-Western-Blot für zwei Stunden bei maximal 50 V und 200 mA durchgeführt. Dazu wurden Filterpapiere in den verschiedenen Kathoden und Anodenpuffern eingeweicht. Das aus den Glasplatten gelöste Trenngel wurde in der Blotkammer zwischen die Filterpapiere gelegt. Es erfolgt eine sandwichartige Aufschichtung, die aus drei in zehnfachem Anodenpuffer getränkten Filterpapieren, gefolgt von drei in einfachem Anodenpuffer getränkten Filterpapieren besteht. Darauf folgten eine Nitrozellulosemembran, das Gel und anschließend drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Sämtliche Luftblasen wurden sorgfältig entfernt.

Kathodenpuffer:

Tris, 25 mM	3,03 g
6-Aminohexansäure, 40 mM	5,25 g
Methanol, 20 %, pH 9,4	Ad 1l

1x Anodenpuffer:

Tris, 30 mM	3,63 g
Methanol, 20 %, pH 10,4	Ad 1l

10x Anodenpuffer:

Tris, 300 mM	36,3 g
Methanol, 20 %, pH 10,4	Ad 1l

Nach Ablauf der Blotzeit wurde die Membran entfernt und mit Ponceaurot-S-Lösung gefärbt. Der Farbstoff dient dazu, das Protein-Bandenmuster sichtbar zu machen, da der Farbstoff sich unspezifisch an alle Proteine anlagert. Der überschüssige Farbstoff wurde durch mehrfaches Waschen der Membran mit Milliporewasser entfernt. Danach wurde die Membran beschriftet und die Bandenhöhe der Marker markiert. Anschließend wurde der Blot fotografiert. Die Membran wurde dreimal mit TBS für zehn min gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für eine Stunde mit Blocklösung behandelt und schließlich dreimal mit der TBST gewaschen. Der spezifische Smad4-Antikörper wurde in TBST + 5%ig BSA gelöst (1:1000). Die Membran wurde in dieser Antikörperlösung bei vier Grad über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran wieder dreimal gewaschen, dann wurde als Zweitantikörper goat-anti-rabbit-HRP in Blocklösung mit Magermilchpulver gelöst (1:2000) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal gewaschen. Der Blot wurde für eine min in ECL-Lösung getränkt, auf eine Glasplatte gelegt und mit einer Klarsichtfolie überspannt. Die ECL-Lösung ist das Substrat für die Meerrettichperoxidase (HRP). Bei der Reaktion werden Lichtquanten freigesetzt, die mit Hilfe einer Kamera detektiert werden. Dies wird als ECL (enhanced chemiluminescence) bezeichnet. Die Meerrettichperoxidase ist fest an den Zweitantikörper gekoppelt, deshalb treten die entsprechenden Proteinbanden als leuchtende Banden auf.

Blocklösung:

Tween 20	0,1 % (vol/vol)
Magermilchpulver	5 % (wt/vol)
1xTBS	Ad 1l

Waschlösung (TBST):

Tween 20	0,1 % (vol/vol)
1xTBS	Ad 1l

3.6 Methoden zur Hypertrophieerfassung in Kardiomyozyten der Ratte

3.6.1 Quantifizierung der Proteinsynthese in Kardiomyozyten mittels Inkorporation von ^{14}C -Phenylalanin

Die Proteinsynthesemessung wurde mittels Inkorporation von ^{14}C -Phenylalanin durchgeführt, da die Aminosäure Phenylalanin fast ausschließlich der Proteinsynthese dient und nicht von Kardiomyozyten metabolisiert wird (Morgan et al., 1971). Die Proteinsyntheserate in einer Zelle kann beim hypertrophen Wachstum höher als in normalen Zellen sein, folglich lässt eine erhöhte Proteinsyntheserate qualitativ auf Hypertrophie schließen. Wie in 3.4.1 beschrieben, wurden die transformierten Kardiomyozyten nach ca. fünf Stunden durch Zugabe von verschiedenen, spezifischen Inhibitoren inkubiert. 30 min später wurden die Zellen mit radioaktiv markiertem ^{14}C -Phenylalanin inkubiert. Zeitgleich wurde ein Teil der Kardiomyozyten zur Hypertrophieentstehung mit PE stimuliert. Dies diente als Positivkontrolle. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Die Inkorporation mit ^{14}C -Phenylalanin wurde nach 24 Stunden durch die Entfernung des Inkorporationsmediums und zweimaliges Waschen der Kulturen mit PBS-Lösung beendet. Damit wurde das nicht eingebaute ^{14}C -Phenylalanin aus den Kulturschalen entfernt. Zur Proteinfällung wurden die Kulturen mit einem ml eiskalter 10%iger TCA bei vier Grad über Nacht

inkubiert. Um zu überprüfen, ob unter allen Versuchsbedingungen die zelluläre Verfügbarkeit und Aufnahme von ^{14}C -Phenylalanin gleich war, wurde die Anwesenheit der markierten Aminosäure im Bestand der zur Proteinsynthese benötigten Vorläufermoleküle (Präkursor-Pool), radioaktiv nachgewiesen. Als Präkursor-Pool wird diejenige Phenylalanin-Fraktion bezeichnet, die zwar von den Kardiomyozyten aufgenommen, aber nicht in Proteine umgesetzt wurde. Um die Menge des markierten ^{14}C -Phenylalanins im intrazellulären Präkursor-Pool zu ermitteln, wurden 500 μl des Überstandes in vier ml Szintillationslösung überführt. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1N NaOH/0,01% SDS (wt/vol) behandelt und anschließend für ca. zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dies führte dazu, dass die Zellen zerstört wurden. Die Überführung von 500 μl dieses Überstandes in vier ml Szintillationslösung erfolgte nach zwei Stunden und es wurde dann das eingebaute ^{14}C -Phenylalanin im β -Counter ermittelt. Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 quantitativ eingesetzt. Dazu wurden 10 μl des Zelllysates in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt. Die Extinktion wurde dann bei 595 nm im Photometer gemessen. Es wurde BSA, das in 1N NaOH/0,01% (wt/vol) SDS gelöst wurde, als Standard zur Quantifizierung des Proteingehalts eingesetzt. Folgende Konzentrationen der Standardreihe wurden verwendet: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml.

3.6.2 Erfassung der Hypertrophie durch Bestimmung der Zellgrößen

Ein weiterer Parameter für die Bestimmung des hypertrophen Wachstums ist die Zellgröße. Hierfür wurde die Zunahme der Zellquerschnittsfläche oder die Cross Sectional Area (CSA) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die in 3.3.1 beschriebenen frisch isolierten Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformiert. 28 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen fotografiert und vermessen. Die Breite und die Länge der einzelnen Zellen wurden gemessen und die Querschnittsfläche der Zellen berechnet:

$$\text{CSA} = \text{radius}^2 \times \pi$$

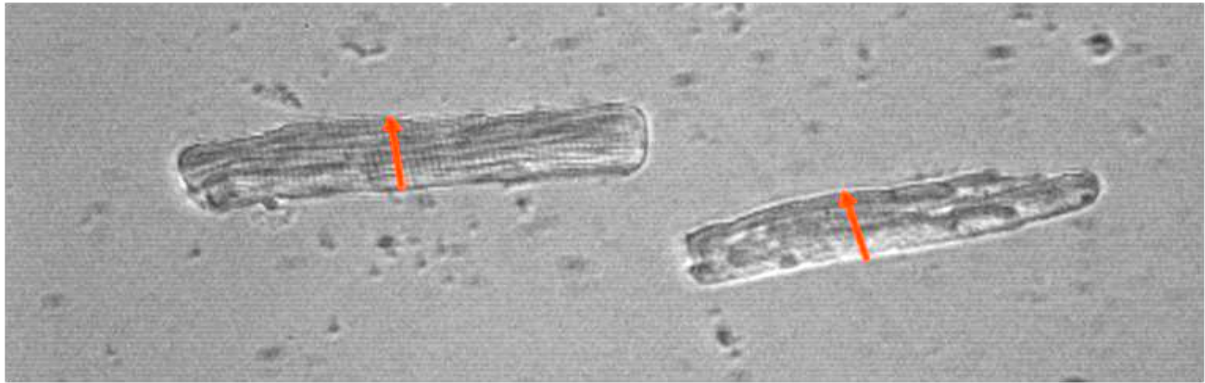


Abb.3.1 Isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten der adulten Ratte unter dem Mikroskop zur Erfassung der Cross Sectional Area.

3.7 Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld

3.7.1 Probenvorbereitung

Bei der Messung von Myokardzellkontraktionen im elektrischen Feld handelt es sich um Übernachtskulturen von isolierten Kardiomyozyten. Die Myozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformiert und ca. fünf Stunden später mit SB202190 (10 μ M), einem spezifischen Inhibitor der p38-MAP-Kinase, inkubiert. Die Messung der Kontraktionsparameter wurde ca. 24 Stunden nach Zugabe des Inhibitors durchgeführt.

3.7.2 Elektrische Stimulation zur Steuerung der Myokardzell-Kontraktion

Wie bereits von Schlüter et al. 1997 beschrieben, soll nun mit dieser Methode speziell die Veränderung der Kontraktilität der Kardiomyozyten untersucht werden. Dazu wurden die Kulturschalen unmittelbar vor der Durchführung des Experiments aus dem 37°C warmen Inkubator herausgenommen, auf den Objektisch eines Mikroskops gestellt und mit einem speziellen Deckel verschlossen. Dieser Deckel war mit vier Öffnungen versehen, welche eine annähernd quadratische Anordnung aufwies, die den Kreis des Deckels maximal ausfüllte. Durch eine dieser Öffnungen ist der Draht, der später an die Kathode des Elektrostimulators angeschlossen

wurde, in das Innere des Deckels geführt worden, so dass er in das Medium der Kulturschale eintauchte und durch eine benachbarte Öffnung wieder nach außen gelangte. Durch die gebogene Form war ein annähernd senkrecht Eintauchen in das Medium gewährleistet. Dann knickte der Draht ab und verlief horizontal durch das Medium. Bevor er das Medium senkrecht verließ, knickte er wieder ab. Auf dieselbe Weise wurde mit dem Draht, der später an die Anode angeschlossen wurde, verfahren. Durch das Anschließen der zwei in der Kulturschale horizontal verlaufenden Drähte an den Stimulator, die als Kathode und Anode in der Schale fungierten, wurde ein elektrisches Feld aufgebaut. Aufgrund der Drahtform war ein homogenes Feld gegeben, so dass ein relativ gleichmäßiger Stromfluss zwischen den beiden Drähten und damit ein relativ gleichmäßiger Stromfluss durch die Zellen zwischen den beiden Drähten herrschte. Die Stimulation zur Kontraktion der Zellen entstand durch die Auslösung biphasischer Stromstöße. Erzeugt wurden diese von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen, die jeweils 0,5 Millisekunden dauerten. Die zeitweise, in unregelmäßiger Frequenz auftretenden Spontankontraktionen wurden durch den Stimulator, der ihnen eine aufgezwungene Stromstoßfrequenz als Kontraktionsfrequenz vorgab, vereinheitlicht. Bei den Experimenten wurden Zellen, die die vorgegebene Frequenz nicht annahmen, nicht berücksichtigt. Durch das Ändern der Stimulationsfrequenz hat man nun den Myokardzellen verschiedene Kontraktionsgeschwindigkeiten vorgegeben. Die Erfassung der Kontraktionsparameter wurde mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg durchgeführt (Abb.3.2).

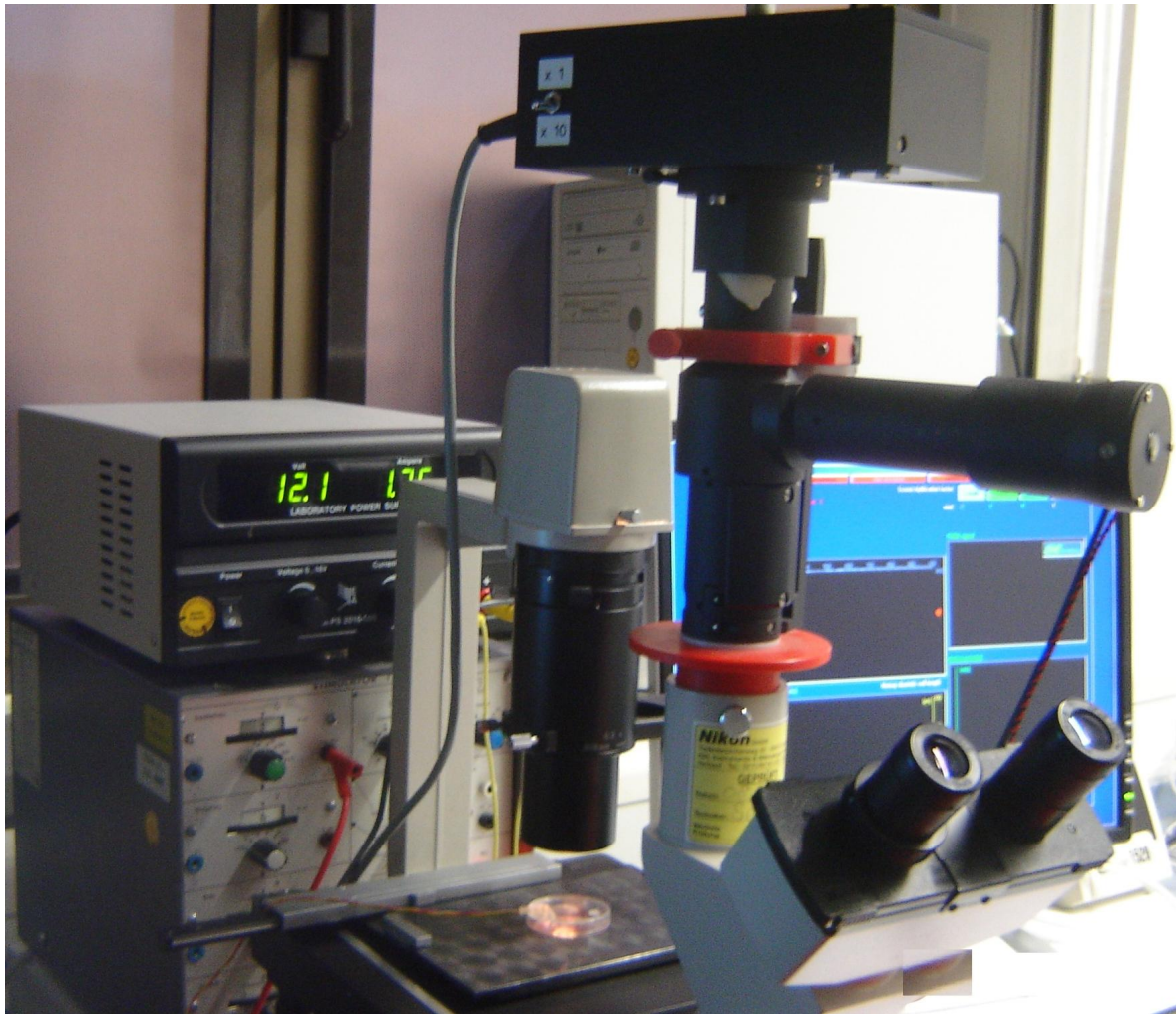


Abb.3.2 Gezeigt ist die Geräteanordnung für die Messung der Zellverkürzung, bestehend aus Mikroskop, Bildschirm, Oszillograph und Zeilenkamera.

3.7.3 Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionen der in der Kulturschale befindlichen Zellen wurden während der Stimulation durch das Mikroskop beobachtet. Mit Hilfe zweier an das Mikroskop angeschlossener Kameras war zum einen die Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor mit einer Videokamera und zum anderem die Einstellung des Hell-Dunkel- bzw. Dunkel-Hell-Übergangs an der Grenze zwischen Zelle und Hintergrund mit einer Zeilenkamera möglich. Zur Beobachtung einer Kontraktion war die Zeilenkamera so zu positionieren, dass sich beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile befanden. Die zu untersuchende Zelle wurde genau in der Mitte des Okularbildes so positioniert, dass beide Zellenden im Erfassungsbereich

der Zeilenkamera lagen. Die Einstellung wurde entweder durch das Bewegen der Kulturschale oder durch das Drehen der Zeilenkamera erreicht, bis man die Zellen im Videobild sehen konnte.

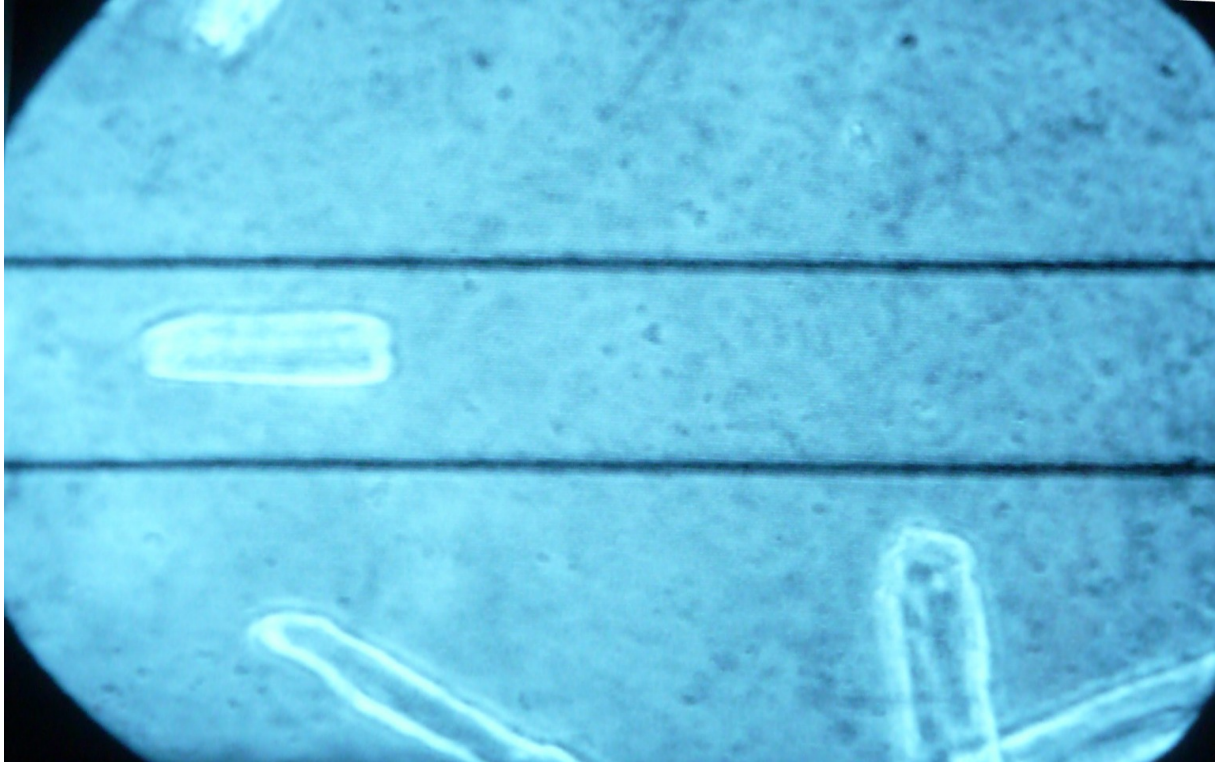


Abb.3.3 Dargestellt sind isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten der adulten Ratte im Bildschirm. Die Zelle wurde in einem elektrischen Feld stimuliert und die Zellverkürzung mit der Kamera aufgenommen.

Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde über das Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit ist auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1 ms/cm und der Vertikalverstärker auf 5 V/div eingestellt gewesen. Um ein stehendes Bild zu erhalten, wurde es für die Bilddarstellung intern getriggert. Die verschiedenen starken Y-Auslenkungen auf dem Oszillographen entstanden durch die verschiedenen Helligkeiten, die von der Zeilenkamera wahrgenommen wurden. Die Amplituden, welche die Zellgrenzen darstellten, konnten an ihrer horizontalen Bewegung erkannt werden. Auf diese Weise war es also möglich, die Zellkontraktion auf dem Oszillographen zu beobachten.

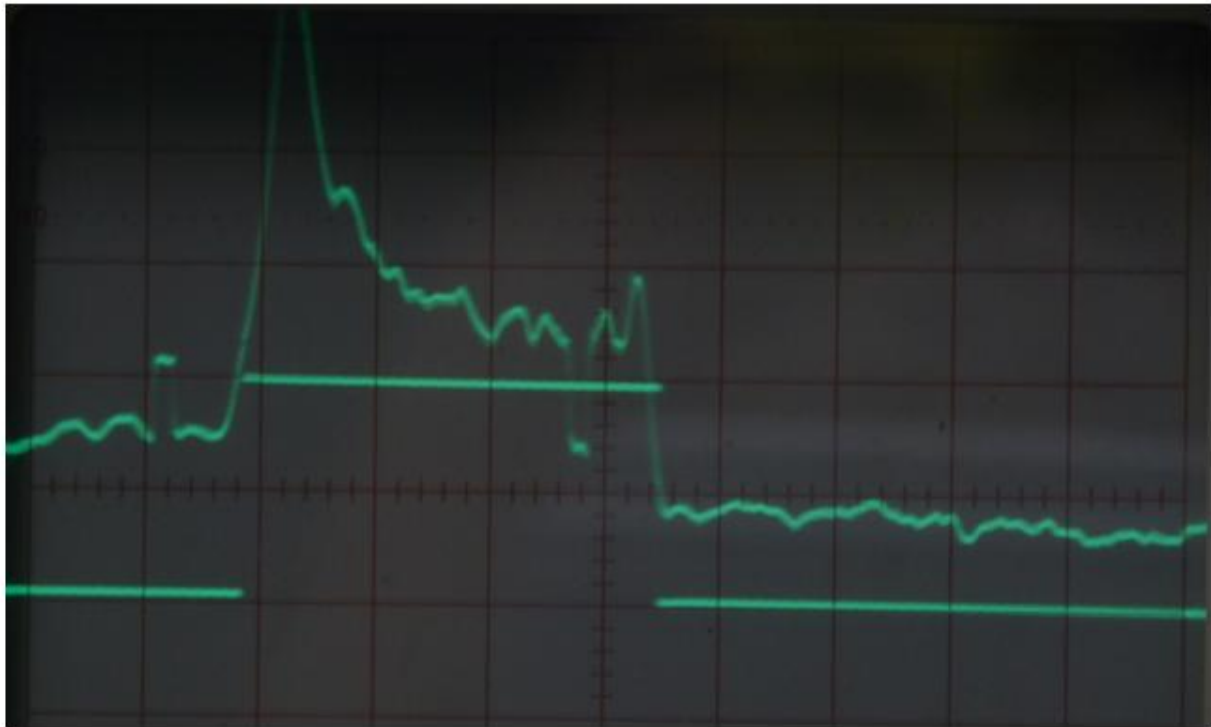


Abb.3.4 Dargestellt ist die Kontraktionskurve eines isolierten ventrikulären Kardiomyozyten. Die Zellen wurden in einem elektrischen Feld stimuliert (0,5; 1 und 2 Hz), um Veränderungen der Kontraktilität zu erfassen. Gezeigt ist die umgewandelte Kontraktionskurve im Oszillograph unter elektrischer Stimulation von 2 Hz.

Der Oszillograph, der als Zweikanaloszillograph betrieben wurde, wies am zweiten Kanal eine feste Spannung des Interfaces auf. Beim Ablesen wurde eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dargestellt und wenn sie nicht abgelesen wurde, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in der Höhe Null. Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface getriggert, indem man einen Triggermarker des Interfaces stellte, der ebenfalls vom Interface auf dem Oszillograph, vor eine Amplitude des Zellbildes, durch eine Amplitude sichtbar gemacht wurde. Erreichte nun die ansteigende Spannung des Zellbildes (sichtbar gemacht durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar gemacht durch die Amplitude des Triggermarkers), so begann der Oszillograph, die

Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen (Abb.3.5). Man beobachtete am Bildschirm des Oszillographen an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe. Wenn die Amplitude des Zellbildes im Zuge der Kontraktion ihre Position veränderte, so veränderte sich auch die Position, an der der Trigger-Wert erreicht wurde. Folglich veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben wanderte. Man konnte die Vor- und Zurückbewegung der oberen Horizontalen an ihrer Kante beobachten. Anhand der Horizontalen hat man also die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante beobachtet. Analog dazu verfuhr man an der anderen Zellkante. Die Weitergabe der Information „Interface-Spannung an“ bzw. „Interface-Spannung aus“ erfolgte vom Oszillograph an das Interface, welche wiederum an einen Computer weitergeleitet wurde. Das Programm, das aus den Informationen „Spannung an“ bzw. „Spannung aus“ die Länge der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt registrierte, ist das MUCCELL Programm der Firma Scientific Instruments GmbH. Das Programm erfasste anhand der Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten eine Kurve, die die Kontraktion der Zelle in Abhängigkeit der Zeit darstellte.

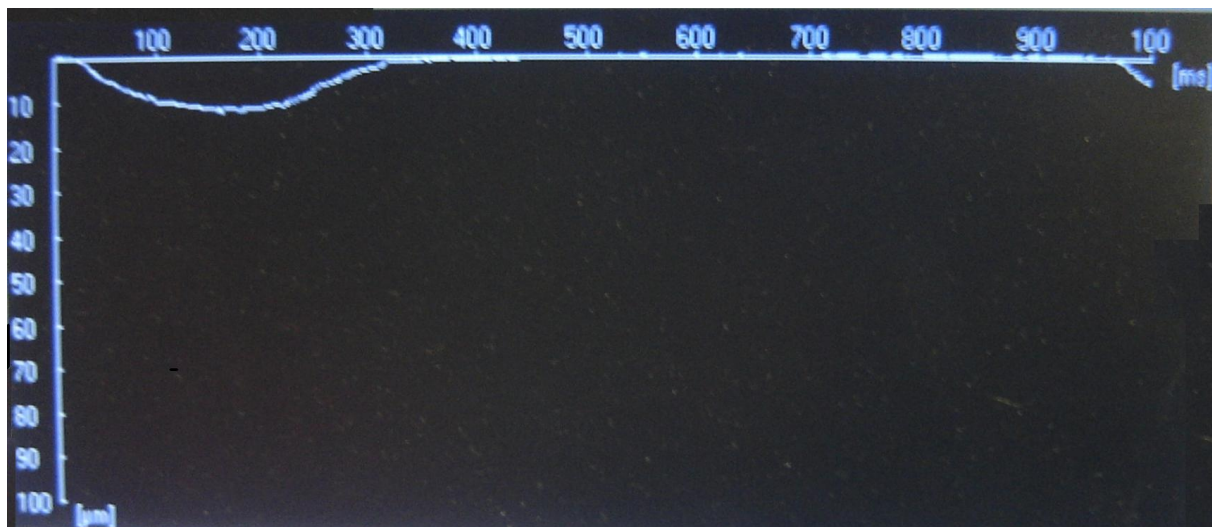


Abb.3.5 Gezeigt ist die Kontraktionskurve eines isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der adulten Ratte, erfasst anhand der Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt ist die entstandene Kontraktionskurve durch eine elektrische Stimulation bei einem Hz.

Der Computer erkannte an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion. Er nahm fünf Kontraktionen auf und ermittelte folgende Werte als Mittelwerte aus diesen vier Einzelmessungen:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometern
2. Die minimale Zelllänge, (systolische Zelllänge) in Mikrometern
3. Die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (Time to peak) in Millisekunden
4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde
6. Die Zeit von der 10%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden („T10-to-Peak“)
7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke („R90-Wert“)

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

1. Der Quotient $\Delta L/L$: Man bildete die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge und dividierte diese Differenz durch die diastolische Zelllänge. In Prozent ausgedrückt, zeigt die $\Delta L/L$ an, um wieviel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
2. Die Con_{max} als Ratenkonstante für die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit: Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wurde durch die Zelllänge der betreffenden Zelle dividiert, um so die Geschwindigkeit auf die Länge zu normieren. Die Con_{max} wurde in der Einheit $[s^{-1}]$ angegeben.
3. Die Rel_{max} als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit: Analog zur Con_{max} wurde die maximale Relaxationsgeschwindigkeit durch die Zelllänge dividiert und in der Einheit $[s^{-1}]$ angegeben.

3.7.4 Messprotokoll

Wie oben beschrieben wurde jede Zelle bei einer Frequenz von einem Hz viermal ausgemessen, wobei die Zeit zwischen zwei Messungen jeweils 15 Sekunden betrug. Nach Übertragung der so erhaltenen vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter in das Programm wurden die Daten weiterverarbeitet.

Mittelwert, Standardabweichung und Median wurden aus diesen jeweiligen vier Mittelwerten bestimmt. Die Messungen wurden bei derselben Zelle noch einmal bei 0,5 Hz und bei zwei Hz durchgeführt. Es wurden pro Rattenherzpräparation jeweils drei bis vier Kulturschalen für verschiedene Bedingungen vorbereitet, wobei je eine Gruppe als Kontrolle diente, in die kein Reagenz zugegeben wurde. Es wurden jeweils drei Zellen pro Kulturschale gemessen.

3.7.5 Statistik und Auswertung der Kontraktionsparameter

Der Mittelwert wurde aus der Zusammenfassung der Einzelkontraktionen der verschiedenen Präparationen ermittelt. Es wurde bei der Auswertung der Kontraktionsparameter pro Zelle und pro Frequenz jeweils ein Wert, also die in den Experimenten erhaltenen Mediane zu Berechnung herangezogen. Die Auswertung der Kontraktionsparameter wurde mit dem Statistik-Programm SPSS durchgeführt. Zum Vergleich zweier Teilexperimente (z.B. Schalen mit und ohne SB) wurden die erhaltenen Parameter mit dem T-Test gegenübergestellt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen untereinander wurde zunächst mit dem ANOVA-Test eine Varianzanalyse durchgeführt. Zur post hoc Analyse wurde der Student-Newman-Keuls- Test angewandt (Godfrey, 1985). Differenzen mit $p < 0,05$ galten als statistisch signifikant. Die Messwerte wurden als Standardfehler vom arithmetischen Mittelwert (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Rolle des Smad4-Proteins bei der Hypertrophieentstehung

4.1.1 Transformation von adulten Kardiomyozyten der Ratte mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden führt zur Reduktion der Smad4 Expression

Mit Hilfe von geeigneten Antisense-Oligonukleotiden kann die Translation von Proteinen inhibiert werden, indem kurze Antisensestränge in der Nähe der Translationstartstelle an die RNA binden. Um die Funktionalität der Smad4-Antisense-Oligonukleotide zu verifizieren, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten von erwachsenen Ratten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformiert und für unterschiedliche Zeiten kultiviert. Als Kontrollzellen wurden Kardiomyozyten der gleichen Präparation ohne Transformation unter ansonst gleichen Kultur-Bedingungen herangezogen. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, ist die Smad4-Proteinmenge bereits nach 18 Stunden reduziert. Nach 28 Stunden liegen nur noch $34,13 \pm 7,06\%$ ($n=4$) des Smad4-Proteins vor und nach 48 Stunden ist die Expression auf $10,75 \pm 2,69\%$ ($n=3$) im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert. Damit wurde gezeigt, dass die Transformation von Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden erfolgreich zu einer Herunterregulation des Smad4-Proteins führt und dass schon nach einem Tag weniger als die Hälfte des Smad4-Proteins in der Zelle vorhanden ist.

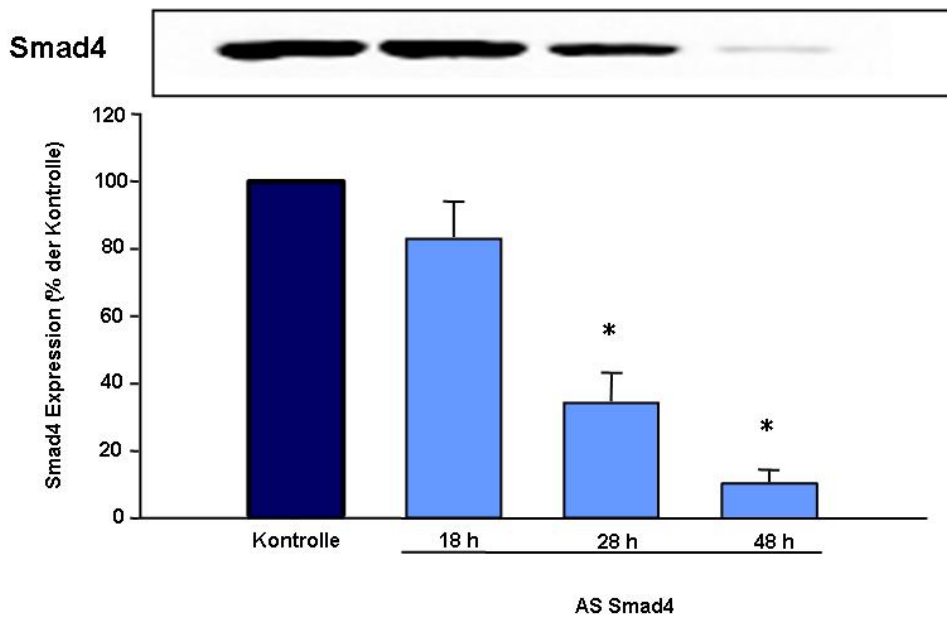


Abb.4.1 Dargestellt ist eine Western-Blot-Analyse von Kardiomyozyten, die für unterschiedliche Zeiten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) transformiert wurden. Gezeigt ist oben in der Abbildung ein repräsentativer Western-Blot. Aufgetragen wurden 60 µg Gesamtprotein. Die untere Abbildung zeigt die quantitative Darstellung der Expression des Smad4-Proteins nach jeweils 18, 28 und 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-4, * $p < 0,05$ vs. Kontrollzellen).

4.1.2 Hemmung der Smad4-Expression führt zur Erhöhung der Proteinsyntheserate

Hypertrophes Wachstum kann mit einer Erhöhung der Proteinsyntheserate einhergehen. Zur Überprüfung, ob die Proteinsyntheserate durch die Inhibition der Smad4-Translation beeinflusst wird, wurden isolierte Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden für ca. 4,5 Stunden transformiert. Die Proteinsyntheserate wurde 24 Stunden nach der Transformation anhand des ^{14}C -Phenylalanineinbaus in die Zellen gemessen. Im Vergleich zu Kontrollzellen ist die Proteinsyntheserate bei den Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformierten Zellen signifikant um $128,85 \pm 2,7\%$ gestiegen. Auch nach 44 Stunden war die Proteinsyntheserate signifikant um $121,80 \pm 8,58\%$ erhöht ohne einen weiteren Anstieg zu zeigen (Abb. 4.2). Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der Smad4-Proteinmenge zu einer Hypertrophieentstehung beiträgt.

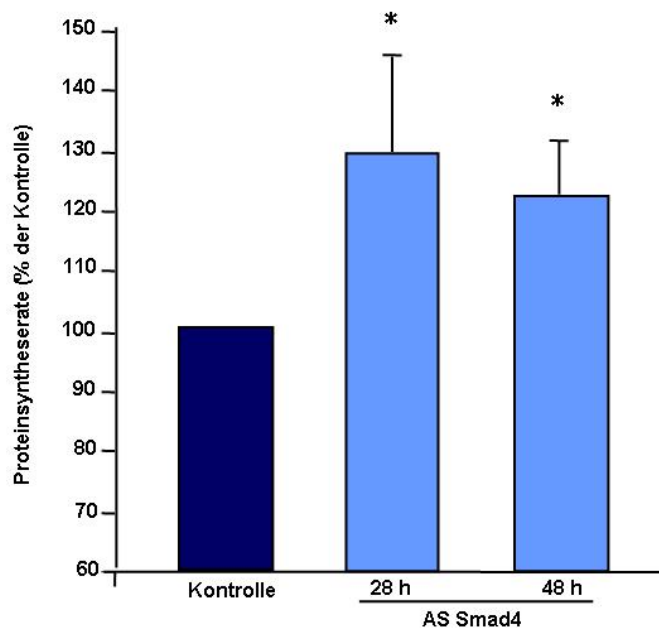


Abb.4.2 Dargestellt ist die quantitative Analyse der Proteinsyntheserate. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) transformiert. Nach 28 und 48 Stunden wurde die Proteinsyntheserate anhand des Einbaus von ^{14}C -Phenylalanin gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=4 - 12$, $*=p<0,05$ vs. Kontrollzellen).

4.1.3 Hemmung der Smad4-Expression führt zu einer Vergrößerung der Kardiomyozyten

Ein weiterer Parameter für die Bestimmung des hypertrophen Wachstums ist die Messung der Zellgröße. Die Querschnittfläche wurde nach der Messung der Breite der einzelnen Zellen berechnet und anschließend in Abbildung 4.3 dargestellt. Die mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformierten adulten ventrikulären Kardiomyozyten zeigten nach 28 Stunden eine signifikante Zunahme der Zellgröße auf $117,74 \pm 6,53\%$. Dies bestätigt die zuvor beobachtete Zunahme der Proteinsyntheserate und zeigt, dass eine Abnahme der Expression des Smad4-Proteins zu einer Hypertrophie führt.

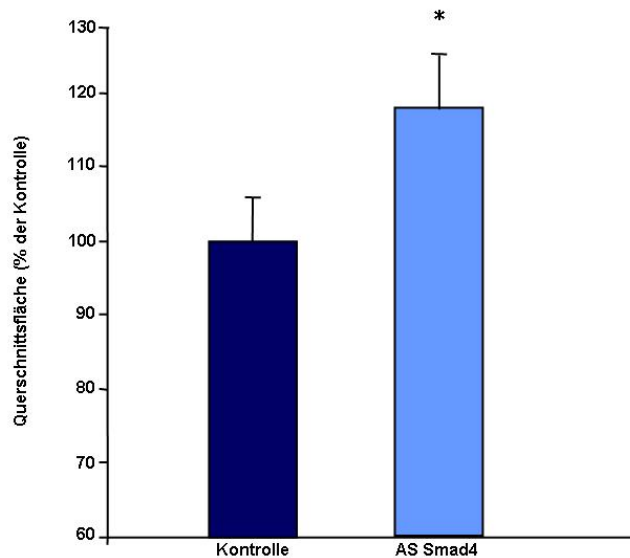


Abb.4.3 Dargestellt ist die Zellgröße der Kardiomyozyten der Ratte. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500nM) transformiert und nach 24 Stunden die Querschnittsfläche mikroskopisch anhand der Zellbreite bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=154 Einzelzellen aus 4 Präparationen, * $p < 0,05$ vs. Kontrollzellen).

4.1.4 Smad4 ist nicht an der α -adrenerg induzierten Hypertrophie beteiligt

Es ist bekannt, dass Kardiomyozyten auf eine α_1 -Adrenozeptor-Stimulation mit einer erhöhten Proteinsyntheserate reagieren (Schlüter et al, 1998). Um den Einfluss von Smad4 auf die Entstehung der Hypertrophie von Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten von erwachsenen Ratten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden und mit dem α -adrenergen Agonisten Phenylephrin (PE) inkubiert. 24 Stunden nach der Inkubation wurde die Proteinsyntheserate als eingebaute Menge an ^{14}C -Phenylalanin gemessen. Abbildung 4.4 zeigt, dass die Proteinsyntheserate der Kardiomyozyten durch Stimulation des α_1 -Adrenozeptors im Vergleich zu Kontrollzellen ansteigt ($152,37 \pm 5,66\%$, $n=22$, $p < 0,001$). Im Vergleich zur PE induzierten Hypertrophie zeigt die Transformation mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden eine etwas niedrigere Proteinsyntheserate ($133,87 \pm 15,75\%$, $n=24$, $p < 0,05$). Bei gleichzeitiger Transformation der Zellen mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden und α -adrenerger Stimulation sieht man jedoch eine signifikante Steigerung der Proteinsyntheserate, die mit $162,52 \pm 9,72\%$ ($n=24$, $p < 0,001$) höher

ist, als in nur Antisense-Smad4-transformierten Zellen. Dies legt nahe, dass der α -adrenerge Weg unabhängig von Smad4 ist.

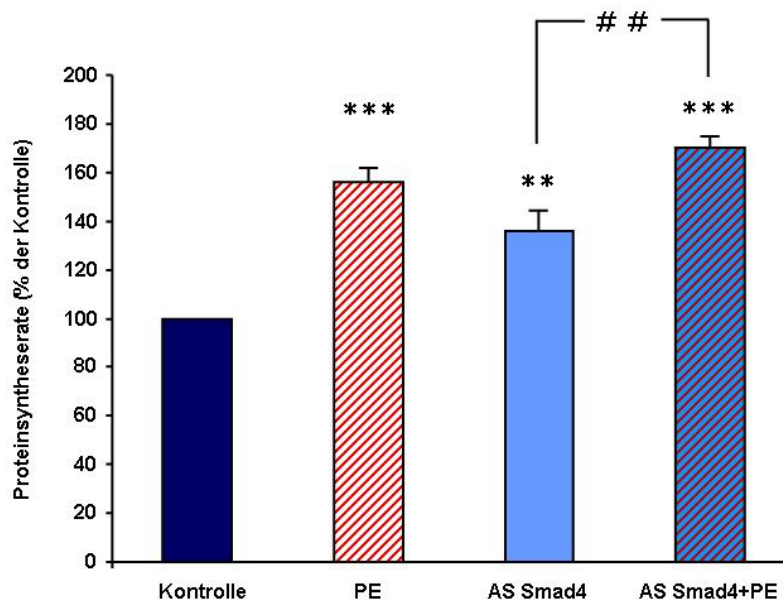


Abb.4.4 Dargestellt ist die quantitative Analyse der Proteinsyntheserate. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) transformiert und 4,5 Stunden später mit PE (10 μ M) stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Proteinsyntheserate anhand des Einbaus von 14 C-Phenylalanin gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=22-24, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ vs. Kontrollzellen).

4.2 Einfluss von Smad4 auf die Entstehung der Hypertrophie und daran beteiligte Signalwege

In den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass eine verringerte Smad4-Expression durch die Transformation von adulten ventrikulären Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden zu einer Steigerung der Proteinsyntheserate führt, die mit einer Vergrößerung der Zellen einhergeht. Für Kardiomyozyten gibt es mehrere Signaltransduktionswege, die an einer Herzhypertrophieentwicklung beteiligt sein können. In den folgenden Versuchen sollte nun der Signalweg, der zur Entstehung der Hypertrophie unter Smad4-Antisense-Oligonukleotiden führt, analysiert werden.

4.2.1 Rolle der PI3-Kinase, Protein-Kinase C und ERK bei der Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelten Hypertrophieentstehung

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die PI3-Kinase, Protein-Kinase C (PKC) und Early Response-Kinase (ERK) bei der durch α -adrenerg-induzierten Hypertrophie eine Rolle spielen. Um den Einfluss der PI3-Kinase, der PKC und der ERK auch bei der, durch Smad4-Antisense-Oligonukleotide induzierten Hypertrophie zu analysieren, wurden die o.g. Kinasen in den folgenden Versuchen jeweils durch einen spezifischen Inhibitor beeinflusst.

4.2.1.1 Hemmung der PI3-Kinase führt zur Reduktion der Proteinsyntheserate

Isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten von Ratten wurden mit Wortmannin, einem spezifischen Inhibitor der PI3-Kinase, über Nacht inkubiert, um den Einfluss von PI3-Kinase auf die Proteinsynthese in Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierten Zellen zu untersuchen. Wie in Abbildung 4.5 dargestellt, erhöht die Transformation mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden die Proteinsyntheserate um $18,25 \pm 7,46\%$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, während bei den mit Wortmannin behandelten Zellen kein Effekt zu erkennen ist. Die zusätzliche Inkubation der mit

Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformierten Zellen mit Wortmannin führt zur signifikanten Hemmung der Proteinsyntheserate im Vergleich zu transformierten Zellen. Diese Ergebnisse zeigen damit eine Beteiligung des PI3-Kinase-Wegs an dem durch Smad4-Antisense-Oligonukleotid induzierten hypertrophen Wachstum der adulten Kardiomyozyten der Ratte. Eine Solche Beteiligung der PI3-Kinase ist bereits auch für die α -adrenerg-induzierte Hypertrophie bekannt.

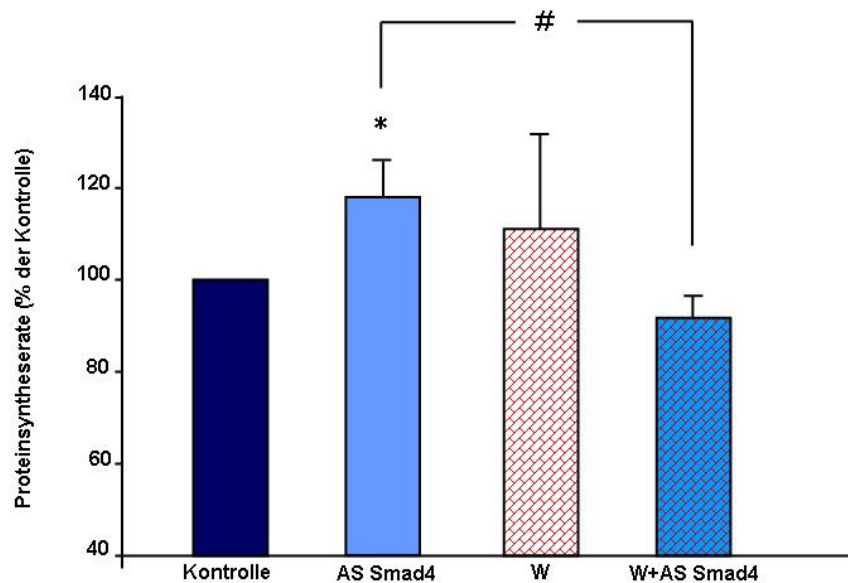


Abb.4.5 Dargestellt ist die quantitative Analyse der Proteinsyntheserate. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) und 4,5 Stunden später mit Wortmannin (10 nM) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Proteinsyntheserate anhand des Einbaus von ^{14}C -Phenylalanin gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6, * $=p<0,05$, vs Kontrollzellen, # $=p<0,05$ AS Smad4 vs. W+AS Smad4).

4.2.1.2 Einfluss der Protein-Kinase C auf die Entstehung der Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelten Hypertrophie

Protein-Kinase C (PKC) ist eine Kinase, die über den α -adrenergen Weg aktiviert wird. Um zu überprüfen, ob PKC auch in der Entstehung der Smad4-vermittelten Hypertrophie von adulten Kardiomyozyten involviert ist, wurde die Proteinsyntheserate der Antisense-Smad4 transformierten Kardiomyozyten in An- und Abwesenheit von Gö6976, einem Inhibitor der PKC, nach 24 Stunden gemessen. Die Proteinsyntheserate ist bei Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erhöht ($131,53 \pm 8,50\%$). Der PKC spezifische Inhibitor Gö allein führt zu keiner Erhöhung der

Proteinsynthese. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden und Gö zeigt keine Reduktion der Proteinsyntheserate ($133,05 \pm 14,72\%$) (Abb.4.6). Dadurch kann man die Mitwirkung der PKC in der Smad4-Antisense-Oligonukleotiden vermittelten Hypertrophie, anders als bei α -adrenerg-induzierten hypertrophen Wachstum, ausschließen.

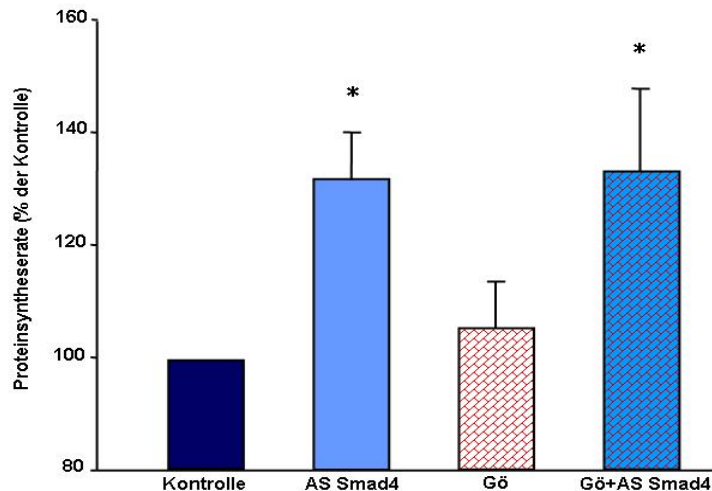


Abb.4.6 Dargestellt ist die quantitative Analyse der Proteinsyntheserate. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) transformiert und 4,5 Stunden später mit Gö6976 (100 nM) über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Proteinsyntheserate anhand des Einbaus von ^{14}C -Phenylalanin gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=11$, $*=p<0,05$, vs. Kontrollzellen).

4.2.1.3 Einfluss von ERK auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Hypertrophieentstehung

Early Response-Kinase (ERK) ist eine weitere Kinase, die in der α -adrenerg-induzierten Hypertrophieentstehung eine Rolle spielt. Um eine Beteiligung der ERK in ventrikulären Kardiomyozyten aus adulten Ratten bei der Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelten Hypertrophie zu untersuchen, wurden die ventrikulären Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformiert und mit dem selektiven MAP-Kinase-Inhibitor PD98059 über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden ist eine signifikante Erhöhung der Proteinsyntheserate der Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierten Kardiomyozyten zu erkennen ($131,53 \pm 7,58\%$). Der Inhibitor PD98059 allein zeigte keinen Einfluss auf die Proteinsyntheserate. Die zusätzliche Inkubation der mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden behandelten Zellen mit PD führt zu keiner Abnahme der Smad4-Antisense-Oligonukleotid

induzierten Hypertrophie ($129,12 \pm 11,98\%$) (Abb. 4.7). Somit kann der ERK-Kinase-Weg für die Smad4-Antisense-Oligonukleotid induzierte Hypertrophie ausgeschlossen werden und unterscheidet sich somit in diesem Punkt von der α -adrenerg-induzierten Hypertrophie.

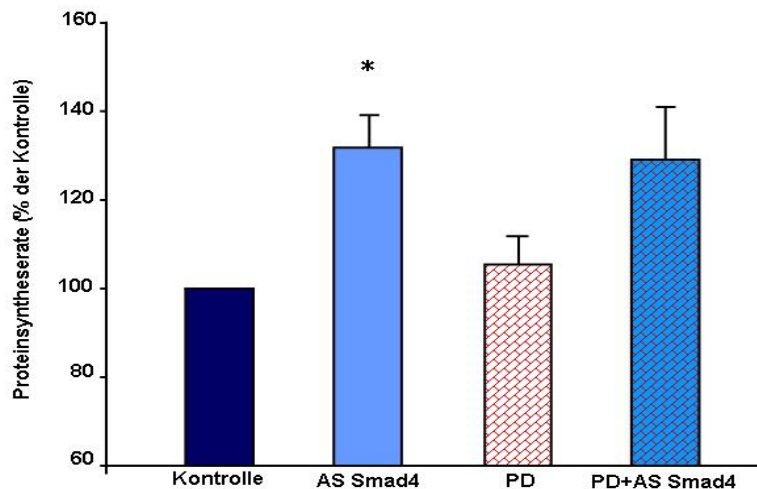


Abb.4.7 Dargestellt ist die quantitative Analyse der Proteinsyntheserate. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) transformiert und 4,5 Stunden später mit PD98059 (10 μ M) über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Proteinsyntheserate anhand des Einbaus von 14 C-Phenylalanin gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6, *= $p < 0,05$, vs. Kontrollzellen).

4.2.2 Hemmung der p38-MAP-Kinase führt zur Reduktion der Smad4-Antisense-Oligonukleotid induzierten Hypertrophie

Um den Einfluss der p38-MAP-Kinase auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Hypertrophie zu untersuchen, wurden adulte ventrikuläre Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformiert und anschließend mit SB202190, einem spezifischen Inhibitor der p38-MAP-Kinase, über Nacht inkubiert. Durch die Messung der Proteinsyntheserate wurde gezeigt, dass der signifikante Anstieg ($159,51 \pm 24,68\%$) der Smad4-Antisense-Oligonukleotid induzierten Hypertrophie durch den Inhibitor der p38-MAP-Kinase, SB202190, vollständig unterbunden wurde ($99,17 \pm 8,91\%$). Der Inhibitor allein zeigte keinen Effekt auf die Proteinsyntheserate (Abb.4.8). Damit wird gezeigt, dass das Wachstum der Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierten Zellen über p38-MAP-Kinase reguliert wird.

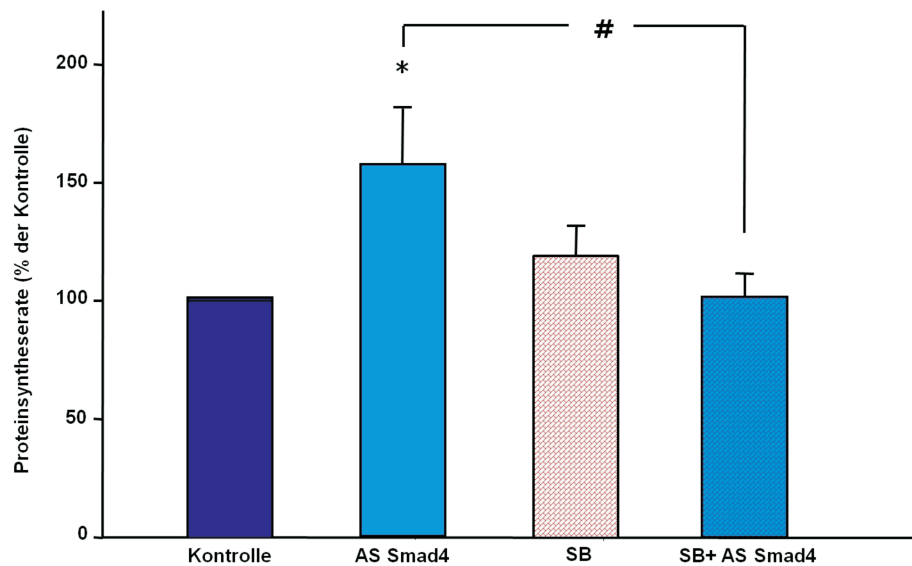


Abb.4.8 Dargestellt ist die quantitative Analyse der Proteinsyntheserate. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) transformiert und 4,5 Stunden später mit SB202190 (10 μ M) über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Proteinsyntheserate anhand des Einbaus von 14 C-Phenylalanin gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=13-14, * p <0,05 vs Kontrollzellen, # p <0,05 AS Smad4 vs. AS Smad4+SB).

4.2.3 Einfluss der NADPH-Oxidase auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Erhöhung der Proteinsyntheserate

Die NADPH-Oxidase ist ein Enzym, welches in der Lage ist, Radikale als Produkt zu bilden, die wiederum p38-MAP-Kinase aktivieren können. Um eine Beteiligung des Enzyms „NADPH-Oxidase“ auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Hypertrophie in den Kardiomyozyten der Ratte zu untersuchen, wurden in diesem Versuch die adulten Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformiert und über Nacht mit Apocynin, einem spezifischen NADPH-Oxidase-Inhibitor, inkubiert. Anschließend wurde der prozentuale Einbau von radioaktiv markiertem 14 C-Phenylalanin in den Zellen gemessen. Die Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierten Zellen zeigten in An- und Abwesenheit von Apocynin einen signifikanten Anstieg der Proteinsyntheserate gegenüber den Kontrollzellen (AS Smad4 $117,19 \pm 5,35$; Apo+AS Smad4 $156\% \pm 9,45$), während allein mit Apocynin inkubierte Zellen keine erhöhte Proteinsyntheserate aufwiesen (Abb. 4.9). Die Inkubation Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierter Kardiomyozyten mit Apocynin führt zusätzlich zu einer signifikanten Steigerung der Proteinsyntheserate.

Die Erhöhung der Proteinsyntheserate von Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierter Zellen durch Apocynin zeigt, dass die NADPH-Oxidase nicht an der Hypertrophieentwicklung beteiligt ist, sondern dass die Hemmung des Enzyms zu einer signifikanten Zunahme der Proteinsyntheserate in Smad4-Antisense-Oligonukleotid stimulierten Zellen führt. Dies weist daraufhin, dass die NADPH-Oxidase nicht an der Smad4-Antisense-Oligonukleotid induzierten Hypertrophieentstehung beteiligt ist, sondern diesen hypertrophen Signalweg sogar reprimieren kann.

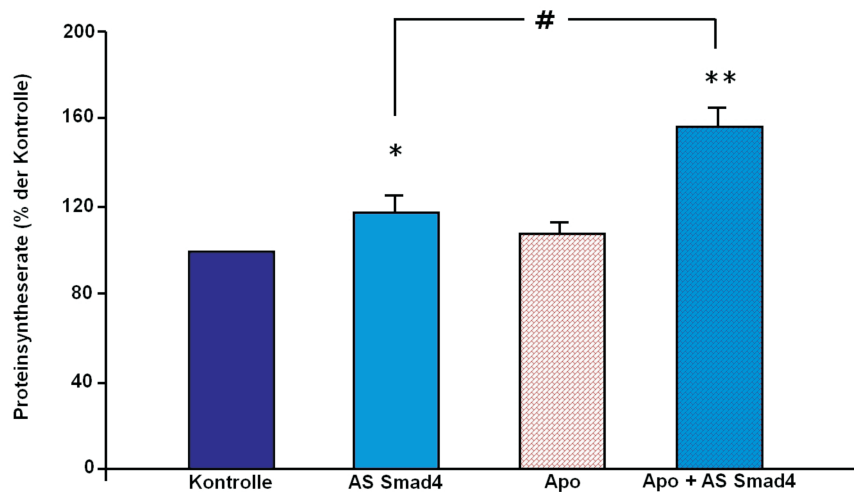


Abb.4.9 Dargestellt ist die quantitative Analyse der Proteinsyntheserate. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500nM) transformiert und 4,5 Stunden später mit Apocynin (10µM) über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Proteinsyntheserate anhand des Einbaus von ^{14}C -Phenylalanin gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8, *=p<0,05, **=p<0,01 vs Kontrollzellen, # =p<0,05 AS Smad4 vs. Apo+AS Smad4).

4.2.4 Einfluss von ROS auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Erhöhung der Proteinsyntheserate

Da die Hemmung der NADPH-Oxidase zu einer weiteren Steigerung der Hypertrophie führt, wurde untersucht inwieweit freie Radikale die Smad4-Antisense-Oligonukleotid induzierte Hypertrophie beeinflussen. Dafür wurden Kardiomyozyten mit Vitamin C über Nacht inkubiert. Das Antioxidans, Vitamin C, ist in der Lage, Radikale wie reaktive Sauerstoffmoleküle zu binden. Nachfolgend wurde die Proteinsyntheserate der Kardiomyozyten anhand des ^{14}C -Phenylalanineinbaus nach 28 Stunden in den Zellen ermittelt (Abb. 4.10). Die Smad4-Antisense-Oligonukleotid

transformierten Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung der Proteinsynthese im Verhältnis zu Kontrollzellen, während bei den mit Vitamin C behandelten Zellen kein Effekt zu erkennen war. Die zusätzliche Behandlung der Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierten Zellen mit Vitamin C zeigte eine ähnlich starke Erhöhung der Proteinsyntheserate wie in den transformierten Zellen allein. Es war jedoch kein additiver Effekt erkennbar. Die erhobenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Eliminierung der Sauerstoffradikale keinen direkten Effekt auf die Smad4-Antisense-Oligonukleotid vermittelte Hypertrophie in adulten Kardiomyozyten hat.

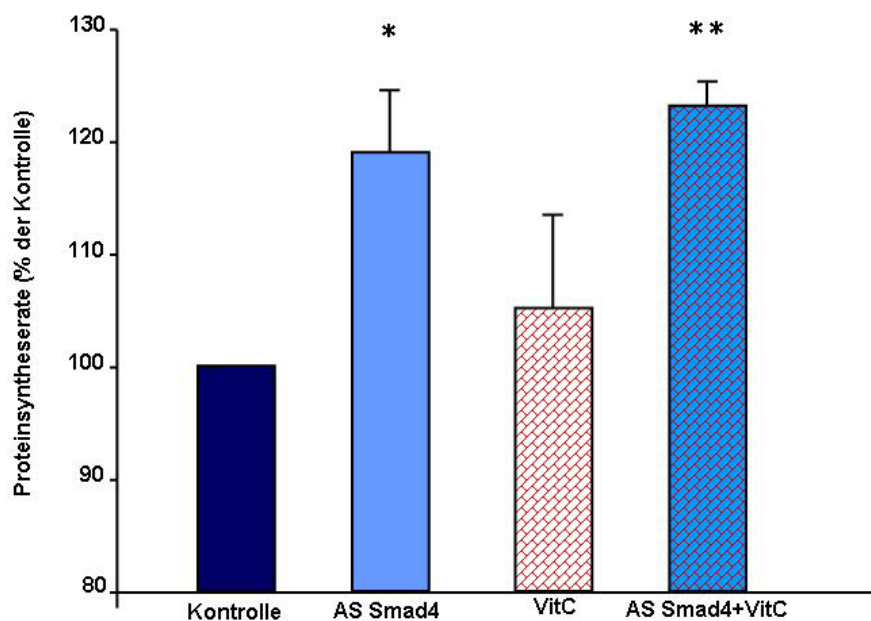


Abb.4.10 Dargestellt ist die quantitative Analyse der Proteinsyntheserate. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500 nM) transformiert und 4,5 Stunden später mit Vitamin C (10 μ M) über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Proteinsyntheserate anhand des Einbaus von 14 C-Phenylalanin gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4, * = p < 0,05, ** = p < 0,01 vs. Kontrollzellen).

4.3 Kontraktionsverhalten Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierter Kardiomyozyten

4.3.1 Hemmung der p38-MAP-Kinase führt zur Verbesserung der Kontraktilität Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierter Kardiomyozyten

Hypertrophes Wachstum einer Zelle kann zusätzlich mit einer eingeschränkten Funktion der Zelle einhergehen. Um zu prüfen, ob Antisense-Smad4 induzierte Hypertrophie auch das Kontraktionsverhalten der Zelle beeinflusst, wurde die Kontraktion der Kardiomyozyten durch Messung der relativen Zellverkürzung dL/L(%) bestimmt. Wie in Abb. 4.11 zu sehen, führt die Transformation der Kardiomyozyten mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden zu einer signifikanten Reduktion der Zellverkürzung (Kontrolle $10,43 \pm 0,49\%$ vs. AS Smad4 $8,83 \pm 0,48\%$). Da das hypertrophe Wachstum der transformierten Zellen abhängig von der p38-MAP-Kinase ist, wurde untersucht, ob auch das Kontraktilitätsverhalten p38-MAP-Kinase-abhängig ist. Dafür wurden adulte ventrikuläre Kardiomyozyten mit Antisense-Smad4 transformiert und mit SB202190 über Nacht inkubiert. Der p38-MAP-Kinase-Inhibitor verbesserte das kontraktile Verhalten der Zellen. Die reduzierte Zellverkürzung in Smad4-Antisense-Oligonukleotid transformierten Zellen wurde durch Einsatz des p38-MAP-Kinase Inhibitors SB signifikant auf das Kontrollniveau erhöht ($10,28 \pm 0,45\%$) (Abb. 4.11). p38-MAP-Kinase ist somit sowohl für das hypertrophe Wachstum, als auch für die eingeschränkte Kontraktilität der Smad4-Antisense-Oligonukleotid behandelten Kardiomyozyten verantwortlich.

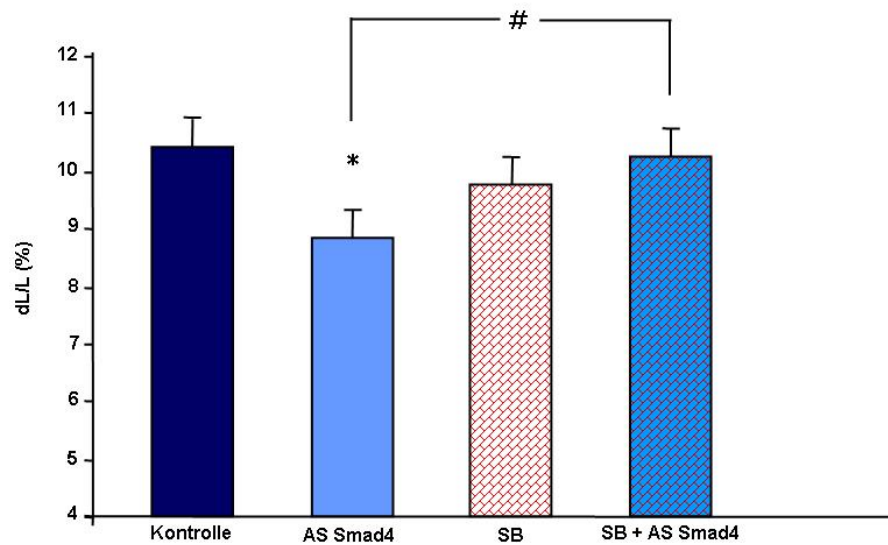


Abb.4.11 Dargestellt ist die relative Zellverkürzung der Kardiomyozyten der Ratte. Adulte Kardiomyozyten wurden mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden (500nM) transformiert und 4,5 Stunden später mit SB202190 (1 μ M) über Nacht inkubiert. 24 Stunden nach der Inkubation wurde die Kontraktion der Zellen bei 2 Hz gemessen und die relative Zellverkürzung der Zellen berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=22-24, *=p<0,05 vs Kontrollzellen, # =p<0,05 AS Smad4 vs. SB+AS Smad4).

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Smad4-Mangel hypertrophes Wachstum in adulten Kardiomyozyten hervorruft. An der durch Smad4-Mangel induzierten Hypertrophie sind sowohl die p38-MAP-Kinase und PI3-Kinase beteiligt, während eine Beteiligung von ERK und PKC an der Hypertrophieentwicklung auszuschließen ist. Neben der Hypertrophieentstehung führte eine reduzierte Expression von Smad4 zusätzlich zu einer verminderten Zellverkürzung. Auch hier konnte eine Beteiligung der p38 MAP Kinase gezeigt werden.

5.1 Modell für einen funktionellen Knock-Out von Smad4

Das Untersuchungsmodell dieser Arbeit waren adulte Kardiomyozyten der Ratte. Um den Einfluss von Smad4 in diesem Zelltyp zu erforschen, sollte ein funktioneller Knock-Out erzeugt werden, um das Smad4-Protein effektiv herunter zu regulieren. Die Wahl fiel hierbei auf den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden. Als Alternative kämen Small interfering RNAs (siRNA), spezielle doppelsträngige RNA-Moleküle, in Frage, die einen Komplex mit der komplementären mRNA bilden, welcher dann von der Zelle abgebaut wird, so dass es nicht zur Translation des Proteins kommt. Diese Methode ist in vielen Zellen erfolgreich einsetzbar, wie z.B. Phanish et al. (2006) in Tubulusepithelzellen von Ratten zeigten. Sie benutzten diese siRNA gegen Smad2 and Smad3 und sahen nach 86 Stunden eine Abnahme der Proteinmenge. Diese Methode kam aber für adulte Kardiomyozyten nicht in Frage, da eine Kultivierung im serumfreien Medium, über diesen langen Zeitraum, für adulte Kardiomyozyten der Ratte nicht möglich ist. Ein weiteres Problem ist die Transfektion der Zellen mit siRNA. Während Zelllinien und auch einige primäre Zellen durch Elektroporation oder mittels Transfektionsreagenzien siRNA aufnehmen können, sind diese Mittel für adulte Kardiomyozyten nicht etabliert bzw. eignen sich nicht, da die Zellvitalität leidet und die Effizienz der Transfektion sehr gering ist.

Der Einsatz von Antisenseoligonukleotiden ist daher eine effiziente und schnelle Methode, um die Expression von Proteinen herunterzuregulieren. In neonatalen Kardiomyozyten der Ratte konnte durch Einsatz von Antisenseoligonukleotiden

gegen Smad1 der Zelltod nach Hypoxie/Reoxygenation gehemmt werden (Masaki et al. 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten Antisense-Smad4-Oligonukleotiden wurden bereits in der Arbeit von Schneiders et al. (2005) verwendet. Hier wurde gezeigt, dass Antisense-Smad4 die TGF β induzierte Apoptose hemmt, was mit Kontroll-Antisense-Oligonukleotiden nicht möglich war. Zur Erhöhung ihrer Stabilität in den Zellen sind die 4 endständigen Nukleotide durch Phosphorthioester modifiziert, sodass sie nicht von der Zelle abgebaut werden können. Innerhalb von fünf Stunden werden sie von der Zelle aufgenommen, ohne dass Transfektionsmittel eingesetzt werden müssen. Die Oligonukleotide haben keinen Einfluss auf die Zellvitalität (Schneiders et al., 2005) und Kontrolloligonukleotide haben auch keinen Einfluss auf das Wachstum der Zelle (Anwar et al., 2008). Somit fiel zur Herstellung eines funktionellen Knock-Outs die Wahl auf den Gebrauch der Antisenseoligonukleotide.

5.2 Smad4 als Wachstumsrepressor in Kardiomyozyten und anderen Zelltypen

Dass Smad4 nicht nur bei der Zellentwicklung und dem Tumorwachstum eine Rolle spielt, sondern auch im Herzen das Wachstum von Kardiomyozyten beeinflusst, zeigten erstmalig Wang et al. (2005) an einer herzspezifischen Smad4 Knock-Out Maus. Durch das Ausschalten von Smad4 im Herzen dieser Maus wurde ein hypertrophes Wachstum ausgelöst (Wang et al., 2005). Neben diesen *in vivo* Modell konnte in der vorliegenden Arbeit an isolierten Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die Expression von Smad4 auf einem physiologischen Expressionsniveau ausreicht, um das hypertrophe Wachstum der Kardiomyozyten zu unterdrücken. Denn sowohl durch Knock-Out in Mäusen, als auch durch Antisense-Smad4-Oligonukleotide in Ratten-Kardiomyozyten konnte die Wachstumshemmung aufgehoben werden. Daraus lässt sich schließen, dass physiologische Konzentrationen von Smad4 benötigt werden, um Hypertrophie zu reprimieren. Ähnliche Befunde zur anti-hypertrophen Wirkung von Smad4 wurden auch von Heger et al. (2009) gezeigt. Hier wurden isolierte adulte Kardiomyozyten der Ratte mit einem Adenovirus infiziert, der Smad4 überexprimiert. Dabei wurde demonstriert, dass nicht-infizierte Kardiomyozyten auf eine α -adrenerge Stimulation mit einer Steigerung der

Proteinsyntheserate und Zunahme der Zellgröße reagierten, während bei Smad4-überexprimierenden Zellen keine Hypertrophie-Entwicklung nach α -adrenerger Stimulation beobachtet wurde. Darüber hinaus konnte durch eine Überexpression von Smad4 neben der Hemmung der Hypertrophie eine gleichzeitige Induktion von Apoptose beobachtet werden (Heger et al., 2009).

Somit hemmt Smad4 die Hypertrophieentwicklung in den Kardiomyozyten basal unter nicht stimulierten Bedingungen und nach Überexpression sogar unter adrenerger Stimulation. Diese Beispiele deuten darauf hin, dass Smad4 eine bedeutende Rolle als negativer Regulator der Hypertrophie zu spielen scheint.

Zahlreiche Untersuchungen konnten die Notwendigkeit von Smad4 für die Entwicklung und das Wachstum in unterschiedlichen Zelltypen belegen. Ko et al. (2007) hatten demonstriert, dass Smad4 in Neuralleistenzellen bei der frühen Zahnentwicklung eine essentielle Rolle spielt. So wurde an einem Neuralleistenzellen spezifischen Smad4 Knock-Out in der Maus demonstriert, dass eine Inaktivierung von Smad4 in Neuralleistenzellen und dessen Derivaten, wie Ektomesenchymzellen, während der frühen Stadien der Zahnentwicklung zu einer Entwicklungshemmung der Zahnleiste, der Inzisiven und Molaren, führt. Auch Lan et al. (2007) konnten die Beteiligung von Smad4 an der Entwicklung, dem Umbau und der Reifung von Endothelzellen der Blutgefäße zeigen. So starben Smad4-Knock-Out Mäuse am 10. Embryonaltag an kardiovaskulären Defekten. Darüber hinaus ist die Rolle von Smad4 und dessen Wirkung am Tumorstadium vielfach identifiziert worden. Schwarte-Waldhoff (2009) konnte zeigen, dass das Smad4 Tumorsuppressorgen in Tumoren des Gastrointestinaltraktes häufig verloren geht oder inaktiv wird. Untersuchungen an Pankreaskarzinom-Zelllinien weisen darauf hin, dass Smad4 einen negativen Effekt auf das Wachstum von Zellen hat (Schwarte-Waldhoff, 2009). Am Modell einer Keratinozyten-spezifischen Smad4 Knock-Out Maus wurde nachgewiesen, dass der Verlust von Smad4 zu Haarausfall und Entstehung von Hauttumoren führt. Nachweislich ist Smad4 für eine katagene Induktion essentiell und spielt eine kritische Rolle als Repressor bei dem Tumorstadium der Haut (Yang et al 2005). Smad4 ist unter anderem ein Tumorrepressorgen, dessen Inaktivierung meist mit dem Übergang zu invasiven Tumorstadien einhergeht. Schwarte-Waldhoff (2009) zeigte, dass die Tumorsuppressorfunktion von Smad4

nicht auf der Vermittlung Wachstum-inhibierender Effekte von TGF- β beruht, sondern vermutlich über komplexere Mechanismen bewirkt wird.

Alle diese Beispiele, bei Tumoren, Endothelzellen und bei der Zahnentwicklung unterstützen die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse, denn in allen Systemen führt eine Inaktivierung oder Reduktion von Smad4 zu einem Anstieg des Wachstums der Zelle.

5.3 Signalwege der Hypertrophie

Wie in 5.2. erwähnt, spielt Smad4 in hypertrophen Prozessen eine Schlüsselrolle. Zum besseren Verständnis des Wirkungsmechanismus von Smad4 ist die Charakterisierung dieses Signalweges von großer Bedeutung. Die Kaskade der Hypertrophie wurde in den letzten Jahren vielfach erforscht, dabei wurde die Beteiligung vieler unterschiedlicher Kinasen demonstriert.

Im Gegensatz zu α -adrenerg vermittelter Hypertrophie ist das GDF15-induzierte Wachstum der Zelle von Smad-Transkriptionsfaktoren abhängig.

Die PI3-Kinase ist eine zentrale Kinase in der Signaltransduktion der Hypertrophie. So wurde eine Aktivierung der PI3-Kinase im Verlauf der β -adrenergen Wachstumsregulation nachgewiesen (Schlüter, 1998, Simm et al., 1998). Pönicke et al. konnten zeigen, dass der α -adrenerg vermittelte Anstieg der Proteinsynthese ebenfalls durch die PI3-K vermittelt wird (Pönicke et al., 2001). Kürzlich zeigten Heger et al. (2010), dass die GDF15-induzierte Hypertrophie durch Verwendung spezifischer Inhibitoren der PI-3Kinase (LY290042, Wortmannin) an isolierten adulten Kardiomyozyten der Ratte ebenfalls zu hemmen ist. In der hier vorliegenden Studie konnte nun ein weiterer hypertropher Signalweg, an dem die PI3-Kinase beteiligt ist, charakterisiert werden, nämlich der unter Antisense-Smad4-induzierte prohypertrophe Signalweg.

Für eine Angiotensin II-induzierte Hypertrophie konnte nachgewiesen werden, dass initial ein Redox-sensitiver Schritt unter Beteiligung einer NADPH-Oxidase abläuft. Als Folge dieses Redox-sensitiven Zwischenschrittes kommt es zur Aktivierung der

p38-MAP-Kinase (Wenzel et al 2001). Auch andere Studien konnten zeigen, dass die Aktivität von p38-MAP-Kinase, induziert durch Stress, mit der Akkumulation von ROS assoziiert ist (Y. James Kang, 2006). Im Unterschied dazu wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass zwar p38-MAP-Kinase aber weder NADPH-Oxidase noch ROS einen Effekt auf die regulatorische Funktion von Smad4 bei der Hypertrophie haben. Die Rolle von p38-MAP-Kinase in der kardialen Hypertrophie zeigte Wenzel et al. (2005) am Modell isolierter adulter Kardiomyozyten der Ratte. Die Aktivität von p38-MAP-Kinase ist ein notwendiger Zwischenschritt für die Induktion eines hypertrophen Wachstums (Wenzel et al. 2005). In dieser Arbeit gelang es nachzuweisen, dass p38-MAP-Kinase auch in Antisense-Smad4-abhängiger Hypertrophie involviert ist. Außer am Herzen wurde der Effekt von Smad4 in Abhängigkeit von p38-MAP-Kinase während der embryonalen Organogenese beobachtet. Bei der Reexpression fetaler Gene unter hypertrophen Bedingungen werden ähnliche Mechanismen, wie sie bei der embryonalen Entwicklung bekannt sind, wirksam (Chien, 1999, Hardt et al. 2004). Ob es allerdings unter Antisense-Smad4 zu Reexpression fetaler Gene kommt, muß noch in nachfolgenden Studien untersucht werden.

Weitere an hypertropher Vergrößerung beteiligte Kinasen sind PKC und ERK. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Antisense-Smad4-induzierte Hypertrophie jedoch sowohl unabhängig von Proteinkinase C als auch unabhängig von ERK abläuft. Dabei ist zu beachten, dass in den Studien an isolierten neonatalen (Zou et al. 1996) und adulten (Wenzel et al. 2005) Kardiomyozyten der Ratte eine Beteiligung der PKC an der Angiotensin II-induzierten Hypertrophie gezeigt wurde. Diese läuft über eine ROS-abhängige Steigerung der TGF β -Expression. Die durch Runterregulierung von Smad4 hervorgerufene Hypertrophie ist dagegen ROS- und TGF β -unabhängig und beschreitet somit völlig andere Signalwege.

Wang et al. (2005) haben an einer herzspezifischen Smad4 Knock-Out Maus gezeigt, dass durch die Unterbindung der Expression von Smad4 hypertrophes Wachstum unter Beteiligung von MEK1 und ERK1/2 induziert wird. Im Unterschied zu Wang et al. wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass die Repressorfunktion von Smad4 bei der Ratte unabhängig von ERK verläuft. Dagegen wurde eine Beteiligung der p38-MAP-Kinase und PI3-Kinase nachgewiesen. Diese

Unterschiede können z.B. durch eine Spezies-spezifische Kinaseaktivität hervorgerufen sein. Während es sich bei dem Knock-Out Tier um ein Mausmodell handelt, erfolgten die Untersuchungen in dieser Arbeit an Ratten. Weiterhin sind bei Untersuchungen in isolierten Zellen systemische Einflüsse und kompensatorische Reaktionen, wie es bei *in vivo* Experimenten bekannt ist, ausgeschaltet. Ein weiterer Unterschied liegt in der Zeitkinetik. In dieser Arbeit wurde das hypertrophe Wachstum bereits 24 Stunden nach hypertropher Stimulation untersucht. Bei der Knock-Out Maus erfolgte die Smad4-Reduktion schon in der Embryonalentwicklung, da die Herzspezifität durch den α -MHC-Promotor erreicht wurde, der schon vor der Geburt in den Vorhöfen aktiv ist. Das heißt Smad4 ist schon vor der Geburt in den Zellen reduziert bzw. ausgeknockt, wodurch auch eine Kompensation hervorgerufen werden kann. Dies alles kann zu den unterschiedlichen Ergebnissen in diesen beiden Modellen führen.

5.4 Einfluss von Smad4 auf die Kontraktilität

Wang et al. (2005) konnten an einer herzspezifischen Smad4 Knock-Out Maus neben dem hypertrophen Wachstum auch noch eine Verschlechterung der kardialen Kontraktilität durch die Unterbindung der Expression von Smad4 zeigen. Dies wurde durch die Arbeitsgruppe Qi et al. (2007) bestätigt. Dabei wurde gezeigt, dass eine Gendeletion von Smad4 am E9,5 der Embryonalzeit zu einer Letalität des Embryos zwischen dem E12,5 und E15,5 führt. Dabei wiesen sie schwerwiegende morphologische Herzfehler auf, die mit einer Reduktion der Expression der Kontraktilitätsmarker, β -MHC, MLC2v und β -kardiales Aktin, einherging. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Kontraktilität der Zellen durch Reduktion der Smad4-Expression verschlechterte. Dabei wurde in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung der p38-MAP-Kinase an der Verschlechterung der Kontraktilität der hypertrophen Kardiomyozyten gezeigt. In dieser Arbeit bleibt ungeklärt, ob die Funktionsverschlechterung mit einer veränderten Genexpression von kontraktilen Proteinen einhergeht. Dies bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammengefasst kann man schließen, dass eine Runterregulation von Smad4 nicht nur auf das hypertrophe Wachstum, sondern auch auf die kontraktile Funktion des

Herzens einen Effekt hat. Sowohl hypertrophes Wachstum, als auch eine Verschlechterung der Kontraktilität des Herzens können zur Herzinsuffizienz führen. Dies legt eine zentrale Rolle von Smad4 im Suffizienzgeschehen nahe.

5.5 Smad4 als endogener Hypertrophierepressor

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass Smad4 einen natürlichen, endogenen Repressor darstellt. In der unstimulierten Zelle wird Smad4 konstitutiv exprimiert. Dies ist auch bekannt für die endogenen Repressoren der Klasse I wie GSK-3 β oder HDAC. Die Klasse I der endogenen Repressoren sind konstitutiv aktiv und verlieren an Aktivität erst nach einer hypertrophen Stimulation. Diese sind somit unter basalen Bedingungen aktiv und halten eine Balance zwischen hypertrophen und antihypertrophen Stimuli. Haq et al. (2000) konnten am Modell kultivierter neonataler Kardiomyozyten der Ratte zeigen, dass eine Downregulation der Expression oder Hemmung der Aktivierung von GSK-3 β , die bereits in aktivierter Form in unstimulierten Kardiomyozyten vorliegt, eine Hypertrophie auslöst. Mehrere unabhängige Studien haben GSK-3 β als endogenen negativen Regulator mit der Fähigkeit, eine Hypertrophieentwicklung basal zu verhindern, identifiziert (Haq et al., 2000).

Auch für HDAC9 konnte nachgewiesen werden, dass es als endogener negativer Regulator der Hypertrophie fungiert (Zhang et al., 2002). Es wurde am Modell der HDAC9 Knock out Maus die Entwicklung einer altersabhängigen kardialen Hypertrophie demonstriert. Der anti-hypertrophe Effekt von HDAC9 wird durch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MEF2 hervorgerufen. Dabei wird MEF2 durch HDAC9 inaktiviert. MEF2 ist ein stark prohypertropher Transkriptionsfaktor, der konstitutiv in unstimulierten adulten Kardiomyozyten im Zellkern exprimiert wird (Muñoz et al., 2009, Potthoff et al., 2007). Diese Hemmung von MEF2 verhindert das hypertrophe Wachstum der Zelle (Zhang et al., 2002). Es ist naheliegend, dass Smad4 als Transkriptionsfaktor ähnliche Mechanismen zur Suppression der Hypertrophie nutzt. Auch für Smads ist bekannt, dass sie mit anderen Transkriptionsfaktoren wie GATA (Lee et al., 2004) und AP-1 (Euler-Taimor et al., 2006) interagierten. GATA ist als Transkriptionsfaktor für die Regulation des

hypertrophen Wachstums in adulten Herzen bekannt (Molkentin, 2000, Pikkarainen et al., 2003, 2004). Die Interaktion zwischen Smad-Proteinen und GATA ist essentiell für die Entwicklung des Herzens (Lee et al., 2004). AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der α -adrenerg-vermittelten Hypertrophie beteiligt ist (Taimor et al., 2004). Eine Interaktion von AP-1 mit Smad spielt bei der Induktion von Apoptose eine entscheidende Rolle (Schneiders et al., 2005). Welche Interaktion Smad4 im anti-hypertrophen Geschehen eingeht, ist bisher nicht bekannt.

Die Tatsache, dass durch den Verlust von Smad4 Hypertrophie entsteht, spricht für eine Aktivität von Smad4 unter basalen Bedingungen wie man es bei GSK-3 β und HDAC9, also Gruppe I der negativer endogenen Regulatoren, findet. Als endogener Inhibitor der Klasse II, die basal kaum oder gar keine Aktivität aufweisen kommt Smad4 nicht in Frage, da die Klasse II Mitglieder wie ICER erst durch einen hypertrophen Stimulus aktiviert bzw. exprimiert werden.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Smad4 ist ein Schlüsselprotein in der Wachstumsregulation adulter Kardiomyozyten, indem es unter physiologischen Bedingungen das Zellgrößenwachstum verhindert. Obwohl Smad4 ein Signalmolekül von TGF β ist, ist dieser hemmende Einfluss von Smad4 auf die Größenzunahme der Kardiomyozyten unabhängig von der Aktivierung des TGF β Signalweges. Smad4 fungiert somit in der Zelle als endogener Repressor, der eine Balance zwischen normalen und hypertrophen Wachstum hält. Dabei wird dieses Gleichgewicht über die p38-MAP-Kinase und die PI3-Kinase reguliert. Beides sind Kinasen, die für das myokardiale Wachstum, ausgelöst durch unterschiedliche Stimuli, bedeutend sind.

In weiteren Studien soll untersucht werden, inwieweit p38-MAP-Kinase und PI3-Kinase über einen gemeinsamen, Antisense-Smad4-abhängigen Signalweg zur Hypertrophie führen oder ob es sich um zwei unabhängige Wege handelt. Da Smad-Transkriptionsfaktoren die Promotorbindung von anderen Transkriptionsfaktoren beeinflussen können, wäre es desweiteren interessant zu untersuchen, ob durch die Reduktion von Smad4 die Aktivierung von anderen Hypertrophie-relevanten

Transkriptionsfaktoren gestört ist. In Betracht kämen hier GATA- und STAT-Transkriptionsfaktoren, aber auch andere Smad-Familienmitglieder.

Da Smad4 als Repressor der Klasse I betrachtet werden kann, ist eine weitere wichtige Frage, ob Smad4 mit anderen Repressoren der Klasse I wie GSK-3 β in Verbindung steht.

Obwohl es viele Therapieansätze gibt, die einer Hypertrophie des Herzens entgegenwirken, gibt es immer noch viele in ihrer Folge auftretende Todesfälle. Deshalb ist die Repression von Hypertrophie wichtig und somit auch, natürlich vorkommende Hypertrophierepressoren zu charakterisieren. In dieser Arbeit konnte die Rolle von Smad4 in der Pathogenese von kardialer Hypertrophie als Hypertrophierepressor aufgezeigt werden. Weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Signalmechanismen, die dieser anti-hypertrophe Wirkung von Smad4 unterliegen, sollten in weiteren Studien folgen.

6 Zusammenfassung

Hypertrophes Wachstum repräsentiert den Schutz des Herzens gegenüber einer erhöhten Druckbelastung. Das Fortschreiten einer Hypertrophie kann zur Dekompensation und Verschlechterung der Herzfunktion führen. Mehrere Studien zeigen, dass Smad-Proteine wesentlich am kardialen Remodelling beteiligt sein können. Ziel dieser Studie war es, die Bedeutung von Smad4 für die kardiale Hypertrophieentwicklung zu untersuchen.

Um zu analysieren, inwieweit Smad4 eine Rolle in der kardialen Hypertrophie-Entwicklung spielt, wurde ein funktioneller Knock-Out von Smad4 in adulten Kardiomyozyten der Ratte mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden herbeigeführt. Die Transformation der Zellen mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden reduzierte die Smad4-Proteinexpression nach 28 Stunden auf $34,68 \pm 7,07 \%$ ($n=4$) und nach 48 Stunden auf $10,75 \pm 2,69 \%$ ($n=3$). Hypertrophieinduktion wurde nach 24 Stunden Inkubation mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden durch ^{14}C -Phenylalanin-Einbau als Proteinsynthese gemessen. Im Vergleich zu Kontrollzellen stieg die Proteinsynthese bei Hemmung von Smad4 auf $133,87 \pm 15,75 \%$ ($n=24$; $p<0,05$). Adrenerge Stimulation mit Phenylephrine (PE) erhöhte die Proteinsyntheserate auf $152,37 \pm 5,66$ ($n=22$; $p<0,001$). Die gleichzeitige Transformation der Zellen mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden und Stimulation mit PE steigerte die Proteinsyntheserate auf $162,52 \pm 9,72 \%$ ($n=24$; $p<0,001$). Um zu überprüfen, welche Signalwege in der Smad4 regulierten Hypertrophie beteiligt sind, wurden verschiedene Kinase-Inhibitoren eingesetzt. Die Gabe des p38-MAP-Kinase Inhibitors SB202190 ($10 \mu\text{M}$) reduzierte die durch Smad4-Inhibition induzierte Hypertrophie auf $95,91 \pm 7,48 \%$ ($n=16$; $p<0,05$ vs. Antisense Smad4). Auch die Hemmung der PI3-Kinase mit dem spezifischen Inhibitor Wortmannin (10 nM) führt zur Reduktion der Antisense-Smad4-induzierten Hypertrophie auf Kontrollniveau. Hingegen konnte der Einsatz des ERK Inhibitors PD98059 ($10 \mu\text{M}$) und des PKC Inhibitors Gö6976 (100 nM) die Proteinsyntheserate nicht senken (Antisense-Smad4 $117,66 \pm 4,99 \%$; $n=10$, Antisense-Smad4 + PD $117,05 \pm 9,44 \%$; $n=11$). Darüber hinaus zeigten Zellen, die mit Smad4-Antisense-Oligonukleotiden transformiert wurden, eine Verschlechterung der kontraktilen Funktion (dL/L Ktr. $10,43 \pm 0,49\%$ vs. Antisense-Smad4 $8,83 \pm 0,48\%$;

n=22-24; $p < 0,05$). Die Reduktion der Zellverkürzung konnte durch Hemmung der p38-MAP-Kinase auf das Kontrollniveau zurückgeführt werden.

Schlussfolgerung: Der Transkriptionsfaktor Smad4 ist nicht an einer α -adrenerg vermittelten Hypertrophie beteiligt. Vielmehr führt die Inhibition von Smad4 basal schon zu einer gesteigerten Proteinsyntheserate, die p38-MAP-Kinase und PI3-Kinase abhängig ist. Weiterhin führt eine Smad4 vermittelte Hypertrophie zur Verschlechterung der Kontraktilität, die über p38-MAP-Kinase reguliert wird. Somit verhindert Smad4 ein hypertrophes Wachstum und eine kontraktile Dysfunktion der Kardiomyozyten unter basalen, unstimulierten Bedingungen. Damit kommt Smad4 eine Schlüsselfunktion bei der Kontrolle der Hypertrophie von adulten Kardiomyozyten zu.

7 Summary

Hypertrophic growth represents a protection of the heart against increased load. However, development of hypertrophy can result in decompensation and deterioration of heart function. Several studies show, that Smad proteins are enhanced during cardiac remodelling and that they may be involved in this process. The aim of this study was to analyze the relevance of Smad4 in the development of cardiac hypertrophy.

To study, if Smad4 plays a role in cardiac hypertrophy we induced a functional knock-out of Smad4 in adult cardiomyocytes of rat by use of antisense Smad4 oligonucleotides. Transformation of cells with antisense Smad4 reduced Smad4 protein expression after 28 h to 34.68 ± 7.07 % (n=4) and after 48 h to 10.75 ± 2.69 % (n=3). The rate of protein synthesis as a marker of hypertrophic growth was measured as incorporation of ^{14}C -phenylalanin 28 h after incubation of cells with antisense Smad4 oligonucleotides. In comparison to controls protein synthesis increased after inhibition of Smad4 to 133.87 ± 15.75 % (n=24; $p < 0.05$). Adrenergic stimulation with phenylephrine (PE) enhanced protein synthesis rate to 152.37 ± 5.66 (n=22; $p < 0.001$). Simultaneous transformation of cells with antisense Smad4 and stimulation with PE elevated protein synthesis rate to the same extent 162.52 ± 9.72 %, n=24; $p < 0.001$). To analyze, which pathways are involved in Smad4 dependent hypertrophy, several kinase inhibitors were applied. The addition of p38-MAP-kinase inhibitor SB202190 (10 μM) reduced Smad4 induced hypertrophy to 95.91 ± 7.48 % (n=16; $p < 0.05$ vs. antisense Smad4). Furthermore, inhibition of PI3-kinase with Wortmannin (10 nM) resulted in reduction of antisense Smad4 induced hypertrophy to control level. However use of ERK inhibitor PD98059 (10 μM) and PKC inhibitor Gö6976 (100 nM) could not decrease the rate of protein synthesis (antisense Smad4 117.66 ± 4.99 %; n=10; antisense Smad4 + PD 117.05 ± 9.44 %; n=11). In addition to the hypertrophy effects of Smad4 contractile function of cardiomyocytes that were incubated with antisense Smad4 was attenuated (dL/L Ctr. 10.43 ± 0.49 % vs. antisense Smad4 8.83 ± 0.48 %; n=22-24; $p < 0.05$). Reduction of cell shortening could be abolished by inhibition of p38-MAP-Kinase.

In conclusion inhibition of Smad4 has no influence on α -adrenergic mediated hypertrophy but leads to increased hypertrophic growth in unstimulated cardiomyocytes that depends on p38-MAP-kinase and PI3-kinase. Also, antisense Smad4 induced hypertrophy resulted in deterioration of contractile function via p38-MAP-kinase. Therefore, Smad4 acts as a repressor of hypertrophy and contractile dysfunction under basal, unstimulated conditions. This characterizes a key role of Smad4 in the control of hypertrophy in adult cardiomyocytes.

8 Literaturverzeichnis

Abbott A: Laboratory animals: the Renaissance rat. *Nature* (2004), 428: 464–466.

Antos CL, McKinsey TA, Frey N, et al. Activated glycogen synthase-3 β suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002), 8: 8.

Anwar A, Schlüter KD, Heger J, Piper HM, Euler G. Enhanced SERCA2A expression improves contractile performance of ventricular cardiomyocytes of rat under adrenergic stimulation. *Pflügers Arch.* (2008), 457(2):485-91.

Aravamudan B, Volonte D, Ramani R, et al. Transgenic overexpression of caveolin-3 in the heart induces a cardiomyopathic phenotype. *Hum. Mol. Genet.* (2003), 12: 2777–2788.

Badorff C, Ruetten H, Mueller S, et al. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 β and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J. Clin. Invest.* (2002), 109: 373–381.

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* (2001), 344:1750–1757.

Borivant M, Pallone F, Di Giacinto C, Fina D, Monteleone I, Marinaro M, Caruso R, Colantoni A, Palmieri G, Sanchez M, Strober W, MacDonald TT, Monteleone G. Inhibition of Smad7 with a specific antisense oligonucleotide facilitates TGF- β 1-mediated suppression of colitis. *Gastroenterology* (2006), 131: 1786–1798.

Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ Jr, Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* (1995), 92: 2385–2390.

Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of

norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J. Clin. Invest.* (1998), 101: 812–818.

Chien, K.R. Stress pathways and heart failure. *Cell* (1999), 98: 555–558.

Clark WA, Decker ML, Behnke-Barclay M, Janes DM, Decker RS. Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long-term primary culture. *Mol. Cell. Cardiol.* (1998), 30: 139–155.

Date MO, Morita T, Yamashita N, et al. The antioxidant N-2-mercaptopropionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2002), 39: 907–912.

Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* (1998), 95: 737–740.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* (2003), 425: 577–584.

Derynck, R., et al. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF-beta family signals. *Cell* (1996), 87: 173.

Dietrich T, Jimenez M, Krall Kaye E, Vokonas P, Garcia R. Age-Dependent Associations Between Chronic Periodontitis/Edentulism and Risk of Coronary Heart Disease DMD, MMSc. *Circulation* (2008), 117: 1668–1674

Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multitasking kinase. *J. Cell. Sci.* (2003), 116: 1175–1186.

Dressel U, Bailey PJ, Wang SC, et al. A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* (2001), 276: 17007–17013.

Duff EK, Clarke AR. Smad4 (DPC4)-a potent tumour suppressor. *Br. J. Cancer.* (1998), 78: 1615–1619.

Erdmann E. Herzinsuffizienz, Ursachen, Pathophysiologie und Therapie. 2003, 3. Auflage, Hrsg., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, ISBN 3-8047 2009-9, S. 3-8.

Euler-Taimor G, Heger J. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* (2006), 69: 15–25.

Feng X.H and Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through SMADs. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* (2005), 21: 659–693.

Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* (2005), 21: 659–1693.

Folco EJ, Koren G. Degradation of the inducible cAMP early repressor (ICER) by the ubiquitin– proteasome pathway. *Biochem. J.* (1997), 328: 37– 43.

Fujita T, Toya Y, Iwatsubo K, et al. Accumulation of molecules involved in alpha1 adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* (2001), 51: 709–716.

Gaussin V, Sadoshima J. beta-adrenergic stimulation activates beta-catenin. *Circulation* (2000), 102:196.

Grau et al. Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor best involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* (1997), 57: 3929.

Gruver CL, DeMayo F, Goldstein MA, Means AR. Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology* (1993), 133: 376–388.

Hanford DS, Thuerauf DJ, Murray SF, Glembotski CC. Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* (1994), 269: 26227–26233.

Haq S, Choukroun G, Kang ZB, et al. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J. Cell. Biol.* (2000), 151: 117–130.

Haq S, Kilter H, Michael A, et al. Deletion of cytosolic phospholipase A2 promotes striated muscle growth. *Nat. Med.* (2003), 9: 944–951.

Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ. Res.* (2002), 90: 1055–1063.

Hardt SE, Sadoshima J. Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovas. Res.* (2004), 63: 500–509.

Heger J, Peters SC, Piper HM, Euler M. GSK-3 β -proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* (2009), 220: 515–523.

Heger J, Schiegnitz E, von Waldthausen D, Anwar MM, Piper HM, Euler G. Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult Cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* (2010), 224: 120–126.

Hirota S, Otsu K, Nishida K, Higuchi Y, Morita T, Nakayama H, Yamaguchi O, Mano T, Matsumura Y, Ueno H, Tada M, Hori M. Involvement of Nuclear Factor- κ B and Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in G-Protein-Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circulation* (2002), 105: 509–515.

Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, et al. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J. Clin. Invest.* (2003), 111: 1399–1407.

Ito H, Adachi S, Tamamori M, Fujisaki H, Tanaka M, Lin M, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M. Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (1996), 28: 1271–1277.

Itoh S. et al. Transforming growth factor β 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J. Biol. Chem.* (1998), 273: 29195–29201.

Kang YJ. Cardiac hypertrophy: a risk factor for QT-prolongation and cardiac sudden death. *Toxicol. Pathol.* (2006), 34: 58–66.

Kim YK, Kim SJ, Yatani A, Huang Y, Castelli G, Vatner DE, Liu J, Zhang Q, Diaz G, Zieba R, Thaisz J, Drusco A, Croce C, Sadoshima J, Condorelli G, Vatner SF. Mechanism of enhanced cardiac function in mice with hypertrophy induced by overexpressed Akt. *J. Biol. Chem.* (2003), 278: 47622–47628.

Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001), 98: 2703–2706.

Ko S, Chung I, Xu X, Oka S, Zhao H, Cho E, Deng C, Chai Y. Smad4 is required to regulate the fate of cranial neural crest cells. *Dev. Biol.* (2007), 312: 435–447.

Koga A, Oka N, Kikuchi T, et al. Adenovirus-mediated overexpression of caveolin-3 inhibits rat cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* (2003), 42: 213–219.

Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y. Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* (1991), 266: 1265–1268.

Kook H, Lepore JJ, Gitler AD, et al. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J. Clin. Invest.* (2003), 112: 863–871.

Kuhn M, Holtwick R, Baba HA, et al. Progressive cardiac hypertrophy and dysfunction in atrial natriuretic peptide receptor (GC-A) deficient mice. *Heart* (2002), 87: 368–374.

Lan Y, Liu B, Yao H, Li F, Weng T, Yang G, Li W, Cheng X, Mao N, Yang X. Essential role of endothelial Smad4 in vascular remodeling and integrity. *Mol. Cell. Biol.* (2007), 27: 7683–7692.

Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunnmon P, Yuan D, Chien KR. Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J. Biol. Chem.* (1988), 263: 7352–7358.

Lee KH, Evans S, Ruan TY, Lassar AB. SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chik NK-kappaB in growth factor regulated type VII collagen gene expression. *Oncogene* (2004), 18: 1837–1844.

Liang Q, Molkentin JD. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2003), 35: 1385–1394.

Liu F, Pouponnot C, Massague J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF-beta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.* (1997), 11: 3157– 167.

Long CS, Ordahl CP, Simpson PC. Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *J. Clin. Invest.* (1989), 83: 1078–1082.

Masaki M, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Kuroda T, Kimura R, Sugiyama S, Terai K, Kitakaze M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Hirota H. Smad1 Protects Cardiomyocytes From Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation* (2005), 111: 2752–2759.

Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF-beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* (2000), 103: 295–309.

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* (2000), 14: 627–644.

Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* (2005), 19: 2783–2810.

Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* (2000), 1: 169–178.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* (1998), 67: 753–791.

Massagué J. TGF- β Signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* (1998), 67: 753–791.

Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF-beta Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell* (2000), 103: 295–309.

Messerli JM, Eppenberger-Eberhardt ME, Rutishauser BM, Schwarb P, von Arx P, Koch-Schneidemann S, Eppenberger HM, Perriard JC. Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy. *Histochemistry* (1993), 100: 193–202.

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* (1993), 75: 875–886.

Molkentin JD, Dorn GW II. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* (2001), 63: 391–426.

Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* (2000), 275: 38949–38952.

Monzen K, Hiroi Y, Kudoh S, Akazawa H, Oka T, Takimoto E, et al. Smads, TAK1, and their common target ATF-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation. *J. Cell. Biol.* (2001), 153: 687–698.

Morgan H, Baker K. Cardiac Hypertrophy. Mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation* (1991), 83: 13–25.

Morgan H, Jefferson L, Wolpert E, Rannels D. Regulation of Protein synthesis in heart muscle. *J. Biol. Chem.* (1971), 246: 2163–2170.

Morgan J, Curran T. Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci.* (1995), 18: 66–67.

Morisco C, Seta K, Hardt SE, et al. Glycogen synthase kinase 3 β regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* (2001), 276: 28586–28597.

Morisco C, Zebrowski D, Condorelli G, et al. The Akt-glycogen synthase kinase 3 β pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* (2000), 275: 14466–14475.

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J. Cell. Sci.* (2001), 114: 4359–4369.

Muñoz JP, Collao A, Chiong M, Maldonado C, Adasme T, Carrasco L, Ocaranza P, Bravo R, Gonzalez L, Díaz-Araya G, Hidalgo C, Lavandero S. The transcription factor MEF2C mediates cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009), 388: 155–160.

Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II. *Circulation* (1998), 98: 794–799.

Ohsawa Y, Toko H, Katsura M, et al. Overexpression of P104L mutant caveolin-3 in mice develops hypertrophic cardiomyopathy with enhanced contractility in association with increased endothelial nitric oxide synthase activity. *Hum. Mol. Genet.* (2004), 13: 151–157.

Oka T, Xu J, and Molkentin JD. Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* (2007), 18: 117–131.

Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redox in disease. *Genes Dev.* (2003), 17: 1937–1956.

Omura T, Yoshiyama M, Yoshida K, Nakamura Y, Kim S, Iwao H, Takeuchi K, Yosikawa J. Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. *Hypertension* (2002), 39: 81–86.

Park DS, Woodman SE, Schubert W, et al. Caveolin-1/3 doubleknockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am. J. Pathol.* (2002), 160: 2207–2217.

Phanish MK, Wahab NA, Colville-Nash P, Hendry BM, Dockrell ME. The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *Biochem. J.* (2006), 393: 601–607.

Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ruskoaho H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc. Res.* (2004), 63: 196–207.

Pikkarainen S, Tokola H, Majalahti-Palviainen T, Kerkela R, Hautala N, Bhalla S, Charron F, Nemer M, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. GATA-4 Is a Nuclear Mediator of Mechanical Stretch-activated Hypertrophic Program. *J. Biol. Chem.* (2003), 278: 23807–23816.

Pinson A, Schlüter KD, Zhou X, Schwarz G, Piper HM. Alpha- und beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (1993), 20: 825–835.

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hutter FJ, Spieckermann PG. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (1982), 14: 397–412.

Pönicke K, Schlüter KD, Heinroth-Hoffmann I, Seyfarth T, Goldberg M, Osten B, Piper HM, Brodde OE. Noradrenalin induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: Involvement of only alpha 1 A adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (2001), 364: 444–453.

Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* (2007), 134: 4131–4140.

Puceat M., Vassort G. Signaling by protein kinase C isoforms in the heart. *Mol. Cell. Biochem.* (1996), 157: 65–72.

Qi X, Yang G, Yang L, Lan Y, Wenig T, Wang J, Wu Z, Xu J, Gao X, Yang X. Essential role of Smad4 in maintaining cardiomyocyte proliferation during murine embryonic heart development. *Develop. Biol.* (2007), 311: 136–146.

Roberts AB. The ever-increasing complexity of TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2002), 13: 3–5.

Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Esteban V, Rupérez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* (2005), 111: 2509–2517.

Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling *Cardiovasc. Res.* (2004), 63: 423–432.

Schlüter K.D. (1998) Untersuchungen zur Regulation der Proteinsynthese adulter ventrikulärer Kardiomyozyten durch hormonelle und neurohumorale Faktoren, Aachen: Shaker, ISBN 3-8265-3535-9.

Schlüter KD, Zhou XJ, Piper HM. Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* (1995), 269: C1311–C1316.

Schneiders D, Heger J, Best P, Piper HM, Taimor G. SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* (2005), 67: 87–96.

Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest.* (2002), 109: 787–796.

Schwarte-Waldhoff I. Funktionen des Tumorsuppressorgens Smad4 in der mehrstufigen Karzinogenese. *BIOspektrum* 3/03 9. Jahrgang

Schwarte-Wardhoff et al. Smad4/Dpc4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2000), 97: 9624.

Sekelsky JJ et al., Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* (1995), 139: 1347–1358.

Simm A, Schlüter KD, Diez C, Piper HM, Hoppe J. Activation of p70s6 kinase by beta-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (1998), 30: 2059–2067.

Sirard C, de la Pompa JL, Elia A, Itie A, Mirtsos C, Cheung A, Hahn S, Wakeham A, Schwartz L, Kern SE, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene *Smad4/Dpc4* is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* (1998), 12: 107–119.

Sugden PH, Fuller SJ, Weiss SC and Clerk A. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Brit. J. Pharm.* (2008), 153: S137–S153.

Sugden PH, Fuller SJ. Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem. J.* (1991), 273: 21–37.

Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after stimulated ischemia. *Cardiovasc. Res.* (2000), 45: 588–594.

Taimor G, Rakow A, Piper HM. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J. Express* (2001), 10: 1096.

Taimor G, Schlüter KD, Best P, Helmig S, Piper HM. Transcription activator protein 1 mediates alpha- but not beta-adrenergic hypertrophic growth responses in adult cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2004), 286: H2369–H2375.

ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* (2004), 29: 265–273.

Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, et al. Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of

cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ. Res.* (2003), 93: 12–22.

Wang J, Xu N, Feng X, Hou N, Zhang J, Cheng X, Chen Y, Zhang Y, Yang X. Smad4 knockout mice Targeted Disruption of Smad4 in Cardiomyocytes Results in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Circ Res.* (2005), 97: 821–828.

Wenzel S, Müller C, Piper HM, Schlüter KD. p38 MAP-kinase in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in hypertrophic signalling. *Europ. J. Heart Failure* (2005), 7: 453– 460.

Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schlüter KD. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J.* (2001), 15: 2291–2293.

Woodman SE, Park DS, Cohen AW, et al. Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* (2002), 277: 38988– 38997.

Xu X, Han J, Ito Y, Bringas Jr. P, Deng C, Chai Y. Ectodermal Smad4 and p38 MAPK are functionally redundant in mediating TGF-β/BMP signaling during tooth and palate development. *Dev. Cell.* (2008), 15: 322–329.

Yamamoto M, Yang G, Hong C, et al. Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* (2003), 112: 1395–1406.

Yang L, Mao C, Teng Y, Li W, Zhang J, Cheng X, Li X, Han X, Xia Z, Deng H, Yang X. Targeted disruption of Smad4 in mouse epidermis results in failure of hair follicle cycling and formation of skin tumors. *Cancer Res.* (2005), 65: 8671–8678.

Yang X, Li C, Xu X, Deng C. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1998), 95: 3667–3672.

Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J. Clin. Invest.* (2001), 108: 1459–1467.

Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu. Rev. Immunol.* (2000), 18: 143–164.

Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, et al. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* (2002), 110: 479– 488.

Zhou XJ, Schlüter KD, Piper HM. Hypertrophic responsiveness to beta2-adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biochem.* (1996), 163/164: 211-216.

Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Yazaki Y. Protein Kinase C, but Not Tyrosine Kinases or Ras, Plays a Critical Role in Angiotensin II-induced Activation of Raf-1 Kinase and Extracellular Signal-regulated Protein Kinases in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* (1996), 271(52): 33592–33597.

9 Anhang

9.1 Publikationsverzeichnis

Poster

Heger J., Poursaket F., Piper H.M., Euler G. (2008). The role of SMAD4 in hypertrophy in adult cardiomyocytes of rat. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung e.V., 74. Jahrestagung, Mannheim.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Farnoush Poursaket

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Danksagung

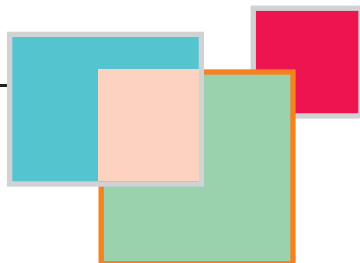
Mein Dank an dieser Stelle gilt Herrn Professor Dr. Dr. H. M.Piper, als Leiter des Physiologischen Instituts, zum Zeitpunkt, als ich meine Arbeit begann.

Danken möchte ich weiter, Frau Professor Dr. Gerhild Euler für die Bereitstellung des Themas, ihre Freundlichkeit und Geduld und die angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und beste Betreuung.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Jacqueline Heger, die mit sehr hilfreichen Anregungen, steter Geduld, ständiger fachlicher Unterstützung und hervorragender Betreuung zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat.

Allen Technischen Angestellten, Yvonne Horn, Sergej Kechter, Daniela Schreiber und Birgit Störr sei ebenfalls gedankt.

Dank auch an Elham, Bettina und Stefan für ihre Unterstützung und die wunderschöne Zeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5840-1



9 783835 195840 1

Coverphoto: © lom123 - Fotolia.com